

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie
(Direktorin: Prof. Dr. med. Petra Ambrosch)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

LOXL4-Expression in Mammakarzinomen: Eine immunhistochemische Untersuchung mit einem monoklonalen anti-LOXL4-Antikörper

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Christian Kademann

aus **Oschatz**

Kiel (2018)

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

**Im Gedenken an meinen
verstorbenen Vater**

Jürgen

Kademann

Inhaltsverzeichnis

I.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	I
II.	TABELLENVERZEICHNIS	II
III.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
IV.	PUFFERLÖSUNGEN UND REAGENZIEN.....	IV
1.	EINLEITUNG	1
1.1	FRAGESTELLUNG	6
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	7
2.1	GEWEBEPROBEN UND KLINISCH-PATHOLOGISCHE DATEN	7
2.2	HERSTELLUNG UND BESCHREIBUNG DER TMA-PROBEN.....	9
2.3	PRIMÄR- UND SEKUNDÄR-ANTIKÖRPER	9
2.4	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG.....	10
2.5	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	11
2.6	STATISTISCHE ANALYSE.....	12
3.	ERGEBNISSE.....	13
3.1	LOXL4-EXPRESSION IN PRIMÄRTUMOREN.....	13
3.2	KORRELATION ZWISCHEN LOXL4-EXPRESSION UND KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN.....	15
3.2.1	LOXL4-Expression und Tumor-Status.....	15
3.2.2	LOXL4-Expression und der Nodal-Status	16
3.2.3	LOXL4-Expression und der Metastasen-Status	17
3.2.4	LOXL4-Expression und das Tumor-Grading.....	18
3.2.5	LOXL4-Expression und die Rezidivrate	19
3.3	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN LOXL4-EXPRESSION UND GESAMTÜBERLEBEN	20
3.3.1	Stadien der LOXL4-Expression in Abhängigkeit vom Gesamtüberleben.....	22
3.4	BEZIEHUNG ZWISCHEN LOXL4-EXPRESSION UND DEM ÖSTROGENREZEPTOR- BZW. PROGESTERONREZEPTOR-STATUS	24
3.4.1	Korrelation zwischen LOXL4-Expressionsstärke und ER-Status in Bezug auf das Gesamtüberleben	26
3.4.2	Korrelation zwischen LOXL4-Expressionsstärke und PgR-Status in Bezug auf das Gesamtüberleben..	30
3.5	BEZIEHUNG ZWISCHEN DER LOXL4-EXPRESSION UND DEM HER2/NEU-REZEPTOR-STATUS.....	34
3.5.1	Korrelation zwischen LOXL4-Expression und Her2/neu-Rezeptor-Status in Bezug auf das Gesamtüberleben	35

4.	DISKUSSION	39
4.1	LOXL4 UND DAS MAMMAKARZINOM.....	40
4.2	DIAGNOSTISCHE WERTIGKEIT DER LOXL4-EXPRESSION	41
4.2.1	Tumor-Status, Nodal-Status, Metastasen-Status	41
4.2.2	Tumor-Grading.....	42
4.2.3	Rezidivrate.....	43
4.2.4	Hormonrezeptor-Status, Her2/neu-Rezeptor-Status.....	43
4.3	PROGNOSTISCHE WERTIGKEIT DER LOXL4-EXPRESSION.....	44
4.3.1	LOXL4-Expressionsstärke und das Gesamtüberleben.....	44
4.3.2	LOXL4-Expression in Korrelation mit dem Hormonrezeptor-Status, bzw. Her2/neu-Rezeptor-Status und das Gesamtüberleben	46
5.	ZUSAMMENFASSUNG	49
6.	LITERATURVERZEICHNIS	50
7.	DANKSAGUNG.....	61
8.	ERKLÄRUNG	62

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersverteilung der Mammakarzinom-Patientinnen bei Erstdiagnose.....	8
Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis von LOXL4. Mammakarzinom mit negativer (A), schwacher (B), moderater (C) und mit starker (D) LOXL4-Expression.....	13
Abbildung 3: Gewebeschnitt einer benignen Mundschleimhautprobe als Negativkontrolle. Das histologische Bild zeigt keine LOXL4-Reaktivität.	14
Abbildung 4: Graphische Darstellung der Überlebenszeit von an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen (Kaplan-Meier-Methode)	21
Abbildung 5: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit von verschiedenen LOXL4-Expressionsstadien (Kaplan-Meier-Methode)	23
Abbildung 6: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom positiven und negativen ER-Status (Kaplan-Meier-Methode).....	27
Abbildung 7: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom positiven und negativen ER-Status mit niedriger und hoher LOXL4-Expression (Kaplan-Meier-Methode).....	29
Abbildung 8: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom PgR-Status (Kaplan-Meier-Methode)	31
Abbildung 9: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom positiven und negativen PgR-Status mit niedriger und hoher LOXL4-Expression (Kaplan-Meier-Methode).....	33
Abbildung 10: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom negativen, positiven und doppelt positiven Her2/neu-Rezeptor-Status (Kaplan-Meier-Methode).....	36
Abbildung 11: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom negativen, positiven und doppelt positiven Her2/neu-Rezeptor-Status mit niedriger und hoher LOXL4-Expression (Kaplan-Meier-Methode)....	38

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der LOXLA-Expression über einen semiquantitativen Maßstab	11
Tabelle 2: Häufigkeit der LOXLA-Expression beim Tumor in situ vs. Primärtumor	14
Tabelle 3: LOXLA-Expressionsstärke in Abhängigkeit vom Tumor-Status	15
Tabelle 4: LOXLA-Expressionsstärke in Abhängigkeit vom pathologisch gesicherten Nodal-Status	16
Tabelle 5: LOXLA-Expression in Abhängigkeit vom Metastasen-Status	17
Tabelle 6: LOXLA-Expression in Abhängigkeit vom Tumor-Grading	18
Tabelle 7: LOXLA-Expression in Abhängigkeit von der Rezidivhäufigkeit	19
Tabelle 8: Überlebensraten beim Mammakarzinom	20
Tabelle 9: Überlebensraten in Abhängigkeit von der LOXLA-Expression	22
Tabelle 10: LOXLA-Expression in Abhängigkeit vom ER-Status	24
Tabelle 11: LOXLA-Expression in Abhängigkeit vom PgR-Status	25
Tabelle 12: Überlebensraten in Abhängigkeit vom ER-Status	26
Tabelle 13: Überlebensraten in Abhängigkeit von der LOXLA-Expression und dem ER-Status	28
Tabelle 14: Überlebensraten in Abhängigkeit vom PgR-Status	30
Tabelle 15: Überlebensraten in Abhängigkeit von LOXLA-Expression und dem PgR-Status	32
Tabelle 16: LOXLA-Expression in Abhängigkeit vom Her2/neu-Rezeptor-Status	34
Tabelle 17: Überlebensraten in Abhängigkeit vom Her2/neu-Rezeptor-Status	35
Tabelle 18: Überlebensraten in Abhängigkeit von der LOXLA-Expression und dem Her2/neu-Rezeptor-Status	37

III. Abkürzungsverzeichnis

DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Dihydrochlorid
ER	Östrogenrezeptor
Her2/neu	humaner, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HIF	Hypoxia-Inducible-Factor
IgG	Immunglobulin G
Ki-67	Proliferationsmarker
LOX	Lysyloxidase
LOXL1-4	Lysyloxidase like Typ 1-4
LTQ- Cofaktor	Lysyl-Tyrosyl-Quinon-Cofaktor
M	molar (mol/Liter)
PgR	Progesteronrezeptor
RKI	Robert-Koch-Institut
SDS-PAA	Sodium Dodecylsulfat-Polyacrylamid
	Gelelektrophorese
SRCR	scavenger receptor cysteine rich domains
Sp1	GC-binding protein (Transkriptionsfaktor)
TBP	TATA-binding protein (Transkriptionsfaktor)
TBS	TRIS gepufferte Kochsalzlösung
Tis	Tumor(Carcinoma) in situ
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor-Node-Metastasis
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

IV. Pufferlösungen und Reagenzien

Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
TBS-Lösung	dest. Wasser, NaCl, Tris/HCl, 1N NaOH → pH 7,4
Zitratpuffer	0,01M Zitronensäuremonohydrat, 10ml 2N NaOH → pH 6,0
Blockierungslösung der endogenen Peroxidase	Methanol mit 1% einer 37%-igen H ₂ O ₂ -Lösung
Blockierungslösung zur Vermeidung unspezifischer Bindungen für Primär- und Sekundärantikörper	TBS mit 10% fötalem Kälberserum
Chromogen-Lösung	1 DAB-Tablette in 15ml TBS-Lösung, plus 20µl einer 37%-igen H ₂ O ₂ -Lösung
Mayer's Häkalaun-Lösung	Mayer's Häkalaun-Lösung und dest. Wasser im Verhältnis 1:2
Streptavidingekoppelte, alkalische Phosphatase-Lösung	Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Antikörper

Bezeichnung	Art/Eigenschaft
Primär-Antikörper	Monoklonaler Maus-anti-LOXL4-Antikörper (Eigenherstellung PD. Dr. rer. nat. Tibor Görögh, HNO-Klinik Kiel)
Sekundär-Antikörper	Polyklonaler, biotinkonjugierter anti-Maus-IgG-Antikörper (Nr. E0354, Dako GmbH, Hamburg)

Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt
DAB	Boehringer GmbH, Mannheim
Destilliertes Wasser	Merck KgaA, Darmstadt
Eukitt	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
H ₂ O ₂	Th.Geyer GmbH & Co. KG, Hamburg
Mayer´s Hämalaun	Merck KgaA, Darmstadt
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt
NaCl	Merck KgaA, Darmstadt
NaOH	Merck KgaA, Darmstadt
Tris/HCl	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen
Xylol-Ersatz-Medium	DiaTec GmbH, Bamberg
Zitronensäure-Monohydrat	Merck KgaA, Darmstadt

Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
Mikrowelle	Samsung; Schwalbach/'Ts
Lichtmikroskop Axioplan	Zeiss; Jena
AxioCam ERc5s Digitalkamera	Zeiss; Jena
SPSS 20.0 Software	SPSS Inc. An IBM Company, Chicago, IL, USA

1. EINLEITUNG

Die Enzyme der Lysyloxidase (LOX)-Familie bestehen insgesamt aus fünf kupferabhängigen Aminoxydasen [LOX, LOX-like (LOXL, LOXL2, LOXL3 und LOXL4)] und sind vielfach im Zusammenhang mit karzinomatösen Erkrankungen untersucht worden (Asuncion *et al.* 2001, Csiszar 2001, Kirschmann *et al.* 2002, Akiri *et al.* 2003, Holtmeier *et al.* 2003, Lucero and Kagan 2006, Scola and Gorogh 2010, Barker *et al.* 2012, Nishioka *et al.* 2012, Xiao and Ge 2012, Wiel *et al.* 2013, Wu and Zhu 2015). Ihr gemeinsames Merkmal ist, dass sie die Quervernetzung zwischen Laminin und Kollagen katalysieren und somit beim Aufbau und der Aufrechterhaltung der Extrazellulärmatrix eine bedeutende Rolle spielen. Darüber hinaus beteiligen sie sich an der Zelladhäsion (Molnar *et al.* 2003), der Kontrolle des Zellwachstums (Csiszar 2001), der Chemotaxis (Lucero *et al.* 2008, Lucero *et al.* 2011), der zellulären Seneszenz und der Tumorgenese (Saito *et al.* 1997, Csiszar 2001, Wiel *et al.* 2013). Andere Autoren sprechen dem LOX-Gen und dessen Familienmitgliedern eine Funktion als Tumorsuppressorgen zu, welches als Antagonist zum *ras*-Onkogen fungiert (Min *et al.* 2007, Wu *et al.* 2007). Zusätzlich zu ihren homologen C-terminalen Domänen, die als Kupfer-Bindungsstelle dienen, oder zu ihren konservierten Lysyl- und Tyrosyl-Resten, die bei der Entstehung des LTQ-Cofaktors (Lysyl-Tyrosyl-Quinon-Cofaktor) für die katalytische Aktivität von LOX sorgen, besitzen die Isoformen LOXL2, LOXL3 und LOXL4 eine fast identische N-terminale Region (Wang *et al.* 1996, Maki *et al.* 2001, Molnar *et al.* 2003). Diese N-terminale Domäne ist durch vier Scavenger Receptor Cysteine Rich Domains (SRCRs) charakterisiert, die sich minimal in ihrem Aufbau und Funktion voneinander unterscheiden (Asuncion *et al.* 2001).

Seit 2001 ist die LOX-Isoform LOXL4 immer häufiger Bestandteil wissenschaftlicher Analysen. Das LOXL4-kodierende Gen ist auf dem Chromosom 10q24 lokalisiert und der 4kb lange kodierende Genbereich enthält 14 Exone (Asuncion *et al.* 2001, Maki *et al.* 2001). Durch Untersuchungen mit

Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten konnte belegt werden, dass an der Regulation der LOXL4-Genexpression die Transkriptionsfaktoren TBP und Sp1 beteiligt sind (Görögh *et al.* 2008). Veränderte Expressionen des LOXL4 Gens sind mehrfach bei verschiedenen Tumorzellen beschrieben worden. Im Jahre 2002 konnten Kirschmann und Mitarbeiter die Überexpression des LOXL4-Gens bei Karzinomzellen, die aus invasiven Mammakarzinomen etabliert wurden, feststellen. Kurze Zeit danach erschienen die ersten Untersuchungsergebnisse von der Überexpression des LOXL4-Gens bei Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes (Holtmeier *et al.* 2003). Die Autoren zeigten in vergleichenden Genexpressionsanalysen, dass die LOXL4-mRNA in malignen Plattenepithelzellen aus Kopf-Hals-Karzinomen eine starke Expression, im Vergleich zu gesunden pharyngealen Epithelzellen, aufweist. Görögh und Mitarbeiter fanden eine signifikante Korrelation zwischen der LOXL4-Genexpression und der Lymphknotenmetastasierung, sowie eine erhöhte Anzahl des LOXL4-Genlocus auf Chromosom 10q24, die mit der LOXL4-Expression assoziierte (Görögh *et al.* 2007). Durch Transfektionsversuche mit Antisense-Oligonukleotiden ließ sich die Überexpression von LOXL4, assoziierend mit dem invasiven Prozess, durch die Kollagen IV/Laminin/Gelatin-Matrix, im Vergleich zu den Kontrollzellen, beweisen. Die Evidenz, dass dieses überexprimierte Protein beim invasiven Verhalten der Zellen eine Rolle spielt, ließ sich auch dadurch erhärten, dass nach Gabe des LOX-Inhibitors Beta-Aminopropionitril das invasive Potential der Zellen verringert wurde (Kirschmann *et al.* 2002).

Wong und Mitarbeiter zeigten bei invasiven und metastasierenden Mammakarzinomen auf, dass die LOXL4-Genexpression durch den Hypoxia-Inducible-Factor (HIF) reguliert wird. Die HIF-induzierte Überexpression von LOXL4 spielt bei der Quervernetzung zwischen Kollagen und Elastin, sowie einer prämetastatischen Nischenbildung eine entscheidende Rolle und steigert somit das invasive und metastasierende Wachstumsverhalten eines Mammakarzinoms (Wong *et al.* 2011).

Obwohl die Überexpression des LOXL4-Gens bei karzinomatösen Erkrankungen bereits für Mammakarzinom-Zellen beschrieben wurde, lagen bis zu Beginn der vorliegenden Studie keine statistisch repräsentativen Untersuchungen über die Expression von LOXL4 auf Proteinniveau bei diesem Malignom der Frau vor. Um sich einen vertieften Einblick über die LOXL4-Expression beim Mammakarzinom zu verschaffen, werden hier zunächst dessen Grundlagen thematisiert.

Das Mammakarzinom ist das am häufigsten auftretende Malignom der Frau. Im Jahr 2013 erkrankten in Deutschland 71.640 Patientinnen mit einer altersstandardisierten Inzidenz von 119,3 (RKI 2016). Das bedeutet, dass statistisch jede 9. Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. Das mittlere Erkrankungsalter lag statistisch bei 64,3 Jahren. Laut Robert-Koch-Institut (RKI) lebten Ende 2013 ca. 316.000 an Brustkrebs erkrankte Frauen in Deutschland. Das Mammakarzinom liegt an der Spitze der malignombedingten Todesursachen in Deutschland. Allein im Jahr 2015 starben 18.136 Patientinnen an einem Mammakarzinom (Destatis 2017).

Zur Ätiologie der Gewebeentartung des Mammakarzinoms wird als Hauptrisikofaktor das zunehmende Alter angesehen (Witherby and Muss 2005). Neben dem Alter zählen zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren kindliche Krebserkrankungen, eine genetisch bedingte, familiäre Häufung (Marshall and Solomon 2007, Petrucelli *et al.* 2010), eine frühe Menarche und eine späte Menopause (Britt 2012, Anothaisintawee *et al.* 2013). Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren zählen Ernährung und Übergewicht (Hauner *et al.* 2011), Alkohol- und Tabakkonsum (Hamajima *et al.* 2002, Roddam *et al.* 2007), mangelnde Bewegung und eine erhöhte Strahlenexposition (Preston *et al.* 2002, Wörmann 2014). Weitere Risikofaktoren sind Nullipara (Britt and Short 2012), Erstgebärende über 30 Jahre (Reinier *et al.* 2007), eine Hormonersatztherapie (Beral and Million Women Study 2003) sowie die Einnahme von oralen Kontrazeptiva über einen längeren Zeitraum (Rosenberg *et al.* 2009). Dagegen hat das Gebären und Stillen

von Kindern eine scheinbar protektive Wirkung (Chang-Claude *et al.* 2000, Inumaru *et al.* 2011).

Einen entscheidenden Anteil am positiven Therapieverlauf hat die Früherkennung des Mammakarzinoms. Neben der Selbstuntersuchung der Brust und der klinischen Abklärungsdiagnostik aus Palpation und Inspektion spielen bildgebende Verfahren eine entscheidende Rolle. In Deutschland empfiehlt die S3-Leitlinie ein qualitätsgesichertes Mammographie-Screening in 2-jährigem Abstand bei Frauen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr (Kreienberg *et al.* 2012). Das Mammographie-Screening führt dabei zu einer signifikanten Senkung der Mortalitätsrate um 15-30% (Bjorkman and Bloom 1957, Lim *et al.* 2004, Rubin *et al.* 2005). Befundabhängig kommt neben der klassischen Mammographie gegenwärtig auch die digitale Mammographie, die Sonographie und in seltenen Fällen auch eine Kontrastmittel-Mamma-Magnetresonanztomographie(MRT) zum Einsatz (Brown 1995).

Nach Feststellung einer radiologischen Auffälligkeit im Bereich der Mamma werden Biopsate minimalinvasiv aus dem verdächtigen Brustgewebe entnommen. Derzeitiger Standard ist die mammographisch-/ultraschallgesteuerte Stanz- oder Vakuumbiopsie, in seltenen Fällen auch eine magnetresonanzzgesteuerte Vakuumbiopsie. Sie dienen der pathologischen Befundung (Kreienberg *et al.* 2012). Das Augenmerk der Untersuchung liegt auf der diagnostischen Einteilung in TNM (Tumor-Node-Metastasis)-Klassifikation (Wittekind and Tischoff 2004) und Tumor-Grading (Bloom and Richardson 1957, Elston and Ellis 1991), sowie dem Nachweis von hormonellen und wachstumsfaktorabhängigen Aktivitäten der Karzinomzellen. Die ermittelten Ergebnisse haben prognostischen, sowie prädiktiven Charakter und dienen neben dem Tumorstaging, auch der Bestimmung des Therapieverfahrens. Neben chirurgischen Maßnahmen mit der Entscheidung zwischen einer brusterhaltenden Therapie (BET) oder einer Ablatio mit/ohne Rekonstruktion der Brust, kann befundabhängig eine Radiotherapie oder eine

systemische (adjuvante/neoadjuvante) Endokrin-, anti-Her2-Antikörper-, Chemotherapie, sowie eine Kombination aus diesen Therapieformen, indiziert sein (Kreienberg *et al.* 2012).

Für die therapeutische Entscheidungsfindung dient die St. Gallen-Empfehlung von 2013 (Harbeck *et al.* 2013). Hierbei wird das primäre Mammakarzinom, als eine systemisch metastasierende und biologisch heterogene Erkrankung, in fünf intrinsische Risikogruppierungen, bestehend aus dem Östrogenrezeptor(ER)-, dem Progesteronrezeptor(PgR)-, dem humanen epidermalen Wachstumsrezeptor 2 (Her2/neu)-Status, dem Tumor-Grading und der Ki-67-Proliferationsrate, mit unterschiedlichem prognostischen und therapeutischen Outcome, eingeteilt (Goldhirsch *et al.* 2011). Der Triple-Negative Tumor (basaler Typ) hat aufgrund seiner Biologie und aus Mangel an gezielten Therapiemöglichkeiten derzeit die schlechteste Prognose (Leidy *et al.* 2014). Zur Bestimmung des individuellen Genexpressionsprofils werden in Deutschland der Oncotype-DX (Paik *et al.* 2004), der Endopredict (Filipits *et al.* 2011) und der Mammaprint-Test (Drukker *et al.* 2013) verwendet.

Die therapeutischen Maßnahmen zielen darauf ab, die Erkrankung unter Vermeidung eines Rezidivs vollständig abzuheilen. Die medikamentöse Tumorthherapie wird in Zukunft immer weiter an Bedeutung gewinnen. Um das Spektrum der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms zu erweitern, sind ständige Bemühungen zur Erforschung weiterer Tumormarker unabdingbar.

1.1 Fragestellung

Bei Mammakarzinomen wurde die Expression von LOXL4 bislang nur auf Transkriptionsebene analysiert. Vor diesem Hintergrund hat sich die Thematik dieser Arbeit entwickelt, eine retrospektive Kohortenstudie zur LOXL4-Expression auf Translationsebene in pathologisch gesicherten Mammakarzinom-Biopsaten mittels Immunhistochemie durchzuführen und eine diagnostische und/oder prognostische Aussagekraft von LOXL4 in dieser Tumorentität zu verifizieren. Die hier erzielten Ergebnisse sollen zur Feststellung beitragen, ob die Höhe der LOXL4-Expression bei der klinisch-pathologischen Diagnostik des Mammakarzinoms berücksichtigt werden kann.

Folgende Fragen standen im Fokus:

- Der Nachweis der Überexpression des LOXL4-Proteins bei Mammakarzinomen
- Die Prüfung einer Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Parametern (Tumor-, Nodal-, Metastasen-Status, Grading, Rezidivrate, ER- und PgR-Status, Her2/neu-Rezeptor-Status) und der LOXL4-Expression
- Die Beziehung zwischen der LOXL4-Expressionsstärke und dem Gesamtüberleben der Patientinnen-Kohorte
- Die Beziehung zwischen der LOXL4-Expressionsstärke und dem Gesamtüberleben unter Berücksichtigung von pathologischen Parametern (ER- und PgR-Status, Her2/neu-Rezeptor-Status)

2. Material und Methoden

2.1 Gewebeproben und klinisch-pathologische Daten

In der vorliegenden Studie wurden formalinfixierte und in Paraffin eingebettete, pathologisch gesicherte, gestanzte Tissue Microarray (TMA)-Gewebeschnitte von 390 Patientinnen mit Mammakarzinomen untersucht. Als Negativproben dienten zehn benigne Mundschleimhautproben aus dem weichen Gaumen von gesunden Probanden, die jeweils im Rahmen von operativen Eingriffen entnommen wurden.

Die Informationen über die jeweiligen Krankheitsverläufe mit klinisch-pathologischen Befunden wurden in einer Datenbank dokumentiert und erlaubten eine Betrachtung der jeweiligen Krankheitsgeschichte der Patientinnen anhand der Follow-Up-Daten.

Zu den klinisch-pathologischen Parametern der Datenbank gehörten:

- Tumor-Status
- Nodal-Status
- Metastasen-Status
- Tumor-Grading
- Rezidivrate
- ER-Status
- PgR-Status
- Her2/neu-Rezeptor-Status

Der Follow-Up-Zeitraum belief sich zwischen 0,09 und 12,10 Jahren und der mediane Follow-Up-Zeitraum betrug 3,59 Jahre. Das Alter der Patientinnen lag bei Diagnosestellung zwischen 28 und 91 Jahren. Das Medianalter betrug 59,29 Jahre. Die quantitative Altersverteilung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ist in *Abbildung 1* dargestellt.

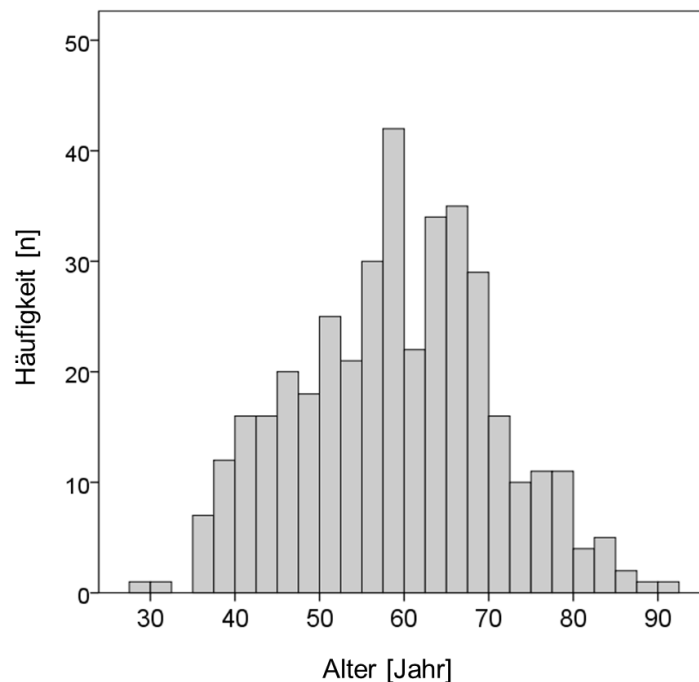


Abbildung 1: Altersverteilung der Mammakarzinom-Patientinnen bei Erstdiagnose

Entsprechend einer von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Kiel befürworteten Einverständniserklärung, wurde von allen Patientinnen die schriftliche Zustimmung zur wissenschaftlichen Bearbeitung des Gewebes, gemäß Helsinki/Tokio-Abkommen (AZ-Nr.: D476/14), eingeholt.

2.2 Herstellung und Beschreibung der TMA-Proben

Die Herstellung der TMA-Proben, sowie die Erstellung der dazugehörigen Datenbank ist vom Universitätsklinikum für Frauenheilkunde der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Zeitraum vom 01.02.1997 bis 21.11.2010 durchgeführt und der Studie zur Verfügung gestellt worden. Auf einem Objektträger befanden sich jeweils 20 Fälle mit je vier Stanzen. Der Durchmesser der Stanzen betrug 1mm und die Stanzen eines Falles wurden im Abstand von 1,1mm gestanzt. Der Abstand zum nächsten Fall betrug in der Horizontalen 2,6mm zum vorherigen Fall. In einer Reihe waren zwei Patientinnenfälle abgebildet.

2.3 Primär- und Sekundär-Antikörper

Die Mammakarzinom-Biopsate wurden mit dem primären, monoklonalen Maus-anti-LOXL4-Antikörper (Eigenherstellung PD. Dr. rer. nat. Tibor Görögh, HNO-Klinik, UKSH Kiel) und einem darauffolgenden sekundären, polyklonalen, biotin-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörper untersucht. Die Spezifität und Sensitivität des LOXL4-Antikörpers wurde mittels SDS-PAA Gelelektrophorese und Western-Blot überprüft und es wurde keine Kreuzreaktion mit anderen Proteinspezies nachgewiesen (Görögh *et al.* 2007, Weise *et al.* 2008). Auch der biotinkonjugierte anti-Maus-IgG-Antikörper wies nach Angaben der Herstellerfirma keine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen auf.

2.4 Immunhistochemische Untersuchung

Zur Vorbehandlung wurden die TMA-Proben für 2x10 min in einem Xylol-Ersatz-Medium entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (2x10 min 100% Ethanol, 1x5 min 95% Ethanol, 1x5 min 80% Ethanol, 1x5 min 70% Ethanol) dehydriert. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Präparate in einer TBS-Lösung für 10 min inkubiert.

Zur Demaskierung der Proben wurde die Mikrowellen-Methode nach Brown und Chirala verwendet (Brown and Chirala 1995). Dabei wurden die auf Objektträger fixierten Proben in eine mikrowellengeeignete Plastikkuvette gelegt, mit Zitratpuffer bedeckt und bei 800 Watt für 14 min erhitzt. Die wieder auf Zimmertemperatur abgekühlten Proben wurden anschließend mit destilliertem Wasser gespült und zur Inhibierung der endogenen Peroxidase-Aktivität in einer ersten Blockierungslösung für 10 min inkubiert. Darauffolgend wurden die Schnitte zuerst mit destilliertem Wasser und dann mit TBS-Lösung gespült. In einem weiteren Schritt wurden die Schnitte mit einer zweiten Blockierungslösung (TBS-mit 10% fötalem Kälberserum) für 5 min bedeckt. Die Immunperoxidase-Methode wurde in Anlehnung an Hsu und Mitarbeitern angewendet (Hsu *et al.* 1981). Die Proben wurden für 60 min mit dem monoklonalen Maus-anti-LOXL4-Antikörper (1µg/ml) bei 1:300 Verdünnung inkubiert. Anschließend wurden die Proben in TBS-Lösung für 3x5 min gespült. Im nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper, ein polyklonaler anti-Maus-IgG-Antikörper, bei einer Verdünnung von 1:300 auf die Tumorschnitte gegeben und für 30 min inkubiert. Es folgte das Spülen mit einer TBS-Lösung für 3x10 min, um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen. Zur Bindung des biotinmarkierten Antigen-Antikörper-Komplexes wurde das Präparat in streptavidingekoppelter, alkalischer Phosphatase-Lösung über 30 min inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Komplexbestände mit TBS-Lösung für 3x2 min abgespült.

Die Visualisierung des Immunkomplexes erfolgte durch Überschichtung der Präparate mit Chromogen-Lösung unter Verwendung von DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Dihydrochlorid) für 20 min. Nach der Chromogen-Färbung wurden die Gewebeschnitte für 10 min in TBS-Lösung inkubiert. Zum Stoppen der Färbung wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gespült. Zur Gegenfärbung wurde Mayer's Hämalaun-Lösung im Verhältnis 1:2 für 30 sec. verwendet. Die Präparate wurden daraufhin unter fließendem Leitungswasser für 10 min gewässert. Zum Abschluss des immunhistochemischen Verfahrens wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in ein Xylol-Ersatz-Medium überführt, mit Eukitt überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

2.5 Mikroskopische Auswertung

Für die Betrachtung der TMA-Proben wurde das Lichtmikroskop Axioplan verwendet. Die Fotodokumentation erfolgte mit der integrierten Mikroskop-Digitalkamera AxioCam ERc5s. Die Begutachtung und mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher, denen zum Zeitpunkt der Auswertung keine der klinisch-pathologischen Befunde bekannt waren. Die Stadieneinteilung der immunhistochemischen Färbung wurde über einen semiquantitativen Maßstab in Anlehnung an Klaes festgelegt (Klaes 2001). Bei der Bewertung der Immunreaktion wurde das gesamte Gesichtsfeld der gestanzten TMA-Proben pro Patientinnenfall bewertet.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der LOXLA-Expression über einen semiquantitativen Maßstab

negativ	<1%
Schwach	<10%
moderat	<25%
stark	>25%

2.6 Statistische Analyse

Die in der Analyse erhobenen Daten wurden mit der Software SPSS 20.0 statistisch ausgewertet. Zu diesem Zweck konnten die in der Datenbank festgehaltenen Ergebnisse verschiedener Vorläuferstudien verwendet werden. Die erhaltenen LOXL4-Expressionsraten wurden mit den klinisch-pathologischen Daten als nominal skalierte Merkmale kodiert und konnten somit in absoluten und prozentualen Häufigkeiten abgebildet werden. In Kontingenztafeln wurde LOXL4 mit einem der genannten Parameter gegenübergestellt und mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson und dem Likelihood-Quotienten auf seine diagnostische Wertigkeit geprüft. Auf diese Weise ließ sich ein Nachweis über eine signifikante Abhängigkeit zwischen einzelnen Daten erstellen. Dabei wurde $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant, $p \leq 0,01$ als statistisch hoch signifikant und $p \leq 0,001$ letztendlich als statistisch höchst signifikant angenommen.

Die Kaplan-Meier-Methode wurde zur Berechnung des Gesamtüberlebens verwendet und sollte Aufschluss über den prognostischen Charakter von LOXL4 als Tumormarker geben (Kaplan 1958). Als Beginn des Beobachtungszeitraums diente das Datum der Erstdiagnose. Zusätzlich wurden die aufgetretenen Todesfälle, die 2-Jahresüberlebensrate und die 5-Jahresüberlebensrate, sowie die mittlere Überlebenszeit in Jahren bestimmt. Mit Hilfe des Log-Rank-Tests konnte der Einfluss der zuvor beschriebenen klinisch-pathologischen Daten auf das Überleben dargestellt werden.

3. Ergebnisse

3.1 LOXL4-Expression in Primärtumoren

In der vorliegenden Arbeit wurde die LOXL4-Expression in 390 primären Mammakarzinom-Biopsaten immunhistochemisch untersucht. *Abbildung 2* veranschaulicht exemplarisch die lichtmikroskopische Darstellung von LOXL4 und die dabei verwendete Stadieneinteilung aufgrund unterschiedlicher Expressionsstärken.

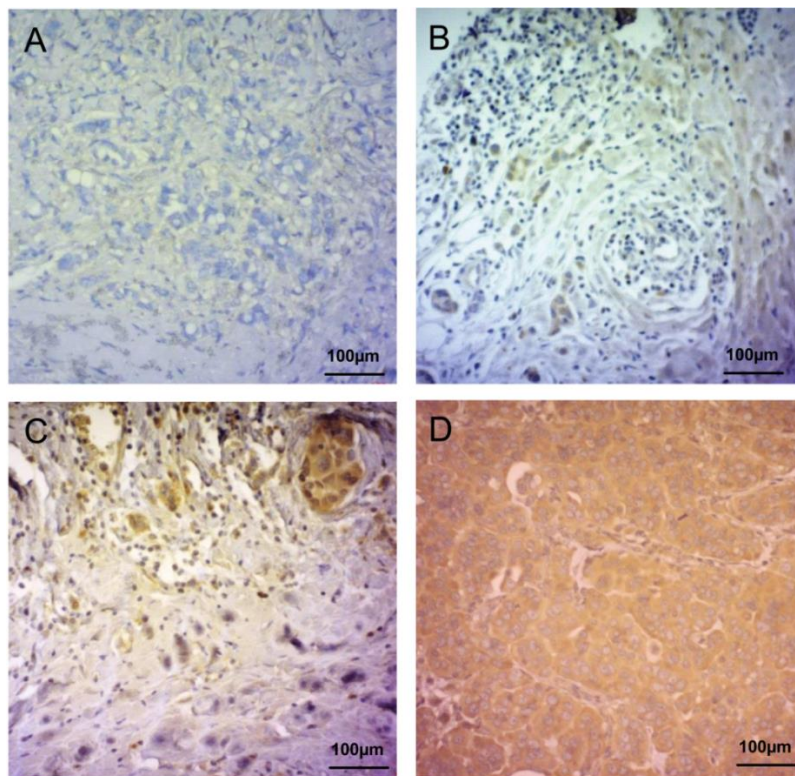


Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis von LOXL4. Mammakarzinom mit negativer (A), schwacher (B), moderater (C) und mit starker (D) LOXL4-Expression

Zum Nachweis der Spezifität des LOXL4-Antikörpers wurden benigne Mundschleimhautproben verwendet, die im Vergleich zu den untersuchten Mammakarzinom-Biopsaten keine LOXL4-Färbung aufwiesen (*Abbildung 3*).

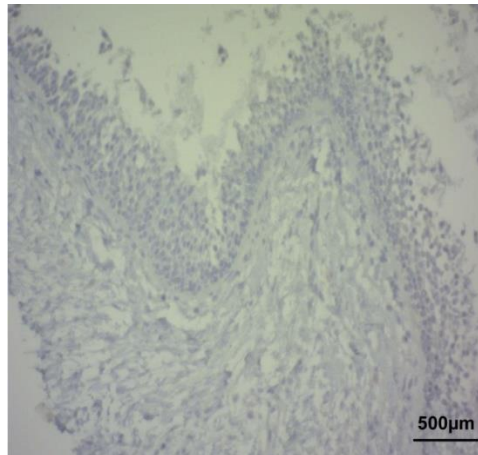


Abbildung 3: Gewebeschnitt einer benignen Mundschleimhautprobe als Negativkontrolle. Das histologische Bild zeigt keine LOXL4-Reaktivität.

Von den insgesamt 390 untersuchten Patientinnen wiesen pathologisch gesichert 11 Proben einen Tis (Tumor in situ) und 379 Proben einen Primärtumor auf. Bei 4 der 11 (36,4%) Tis-Biopsaten konnte eine positive LOXL4-Expression nachgewiesen werden. Insgesamt 377 der 379 (99,5%) Primärtumore wiesen eine positive LOXL4-Expression (schwach/moderat/stark) auf. Die Häufigkeit der untersuchten Tumor-Biopsate, verglichen mit deren LOXL4-Reaktivität, ist in *Tabelle 2* zusammengefasst.

Tabelle 2: Häufigkeit der LOXL4-Expression beim Tumor in situ vs. Primärtumor

		Tumor in situ (Tis) [n]	Primärtumore (T 1-4) [n]	Gesamt [n]
LOXL4	negativ	7 (63,6%)	2 (0,5%)	9 (2,3%)
	positiv	4 (36,4%)	377 (99,5%)	381 (97,7%)
Gesamt [n]		11	379	390

3.2 Korrelation zwischen LOXL4-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

3.2.1 LOXL4-Expression und Tumor-Status

Um die diagnostische Wertigkeit der LOXL4-Expression bei Mammakarzinom-Biopsaten zu bewerten, wurden zuerst die Ergebnisse der LOXL4-Expressionsstärke mit dem pathologisch gesicherten Tumor-Status statistisch verglichen. Bei dieser Analyse konnte ein Zusammenhang zwischen beiden Parametern festgestellt werden (*Tabelle 3*). Von 251 T1-Tumoren färbten sich 232 Tumore (92,4%) schwach, von 106 T2-Tumoren färbten sich 85 Tumore (80,2%) moderat an und bei 22 T3- und T4-Tumoren wiesen 20 Proben (90,9%) eine starke Färbung auf.

Tabelle 3: LOXL4-Expressionsstärke in Abhängigkeit vom Tumor-Status

		Tumor-Status					Gesamt [n]
		Tis [n]	T1 [n]	T2 [n]	T3 [n]	T4 [n]	
LOXL4	negativ	7 (63,6%)	2 (0,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (2,3%)
	schwach	3 (27,3%)	232 (92,4%)	20 (18,9%)	0 (0%)	0 (0%)	255 (65,4%)
	moderat	1 (9,1%)	17 (6,8%)	85 (80,2%)	1 (20%)	1 (5,9%)	105 (26,9%)
	stark	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,9%)	4 (80%)	16 (94,1%)	21 (5,4%)
Gesamt [n]		11	251	106	5	17	390

Die Analyse der Daten zwischen der LOXL4-Expression und dem Tumor-Status ergab eine statistische Signifikanz ($p < 0,001$).

3.2.2 LOXL4-Expression und der Nodal-Status

Um weitere Aussagen über die diagnostische Wertigkeit von LOXL4 zu treffen, wurde die Beziehung zwischen der LOXL4-Expressionsstärke und dem Nodal-Status statistisch geprüft. Von den insgesamt 390 Primärtumoren wurde bei 380 Patientinnen der Nodal-Status nach pathologischer Beurteilung gesichert, für 10 Proben hingegen war kein Nodal-Status bekannt. Bei 251 Patientinnen (66,1%) konnten keine Lymphknotenmetastasen (N0) diagnostiziert werden. Bei 129 Patientinnen (33,9%) konnten metastasierende Veränderungen im Lymphknotengewebe und somit ein positiver Nodal-Status (N+) verifiziert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: LOXL4-Expressionsstärke in Abhängigkeit vom pathologisch gesicherten Nodal-Status

		Nodal-Status		Gesamt [n]
		N0 [n]	N+ [n]	
LOXL4	negativ	9 (3,6%)	0 (0,0%)	9 (2,4%)
	schwach	188 (74,9%)	63 (48,8%)	251 (66,1%)
	moderat	52 (20,7%)	50 (38,8%)	102 (26,8%)
	stark	2 (0,8%)	16 (12,4%)	18 (4,7%)
Gesamt [n]		251	129	380

Die Analyse der Daten ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen beiden Parametern ($p < 0,001$).

3.2.3 LOXL4-Expression und der Metastasen-Status

Als Nächstes wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem Metastasen-Status von Mammakarzinom-Patientinnen besteht. Von den 390 Patientinnen mit gesichertem Primärtumor wurden 360 zur Lokalisation von Metastasen routinemäßig untersucht. Von dieser Patientinnen-Kohorte besaßen 12 (3,3%) Proben (M+) einen positiven und 348 (96,7%) Proben (M0) einen negativen Metastasen-Status.

Tabelle 5: LOXL4-Expression in Abhängigkeit vom Metastasen-Status

		Metastasen-Status		Gesamt [n]
		M0 [n]	M+ [n]	
LOXL4	negativ	8 (2,3%)	0 (0,0%)	8 (2,2%)
	schwach	240 (69,0%)	4 (33,3%)	244 (67,8%)
	moderat	87 (25,0%)	4 (33,3%)	91 (25,3%)
	stark	13 (3,7%)	4 (33,3%)	17 (4,7%)
Gesamt [n]		348	12	360

Nach statistischer Auswertung der in der *Tabelle 5* aufgeführten Werte ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen LOXL4-Expression und dem Metastasen-Status feststellen ($p < 0,001$).

3.2.4 LOXL4-Expression und das Tumor-Grading

Es sollte weiterhin der Fragestellung nachgegangen werden, ob ein Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem Tumor-Grading besteht. Die Statistik enthielt insgesamt 370 Patientinnen mit einem pathologisch gesicherten Tumor-Grading. Davon konnten 42 G1-Tumore (11,3%) als hoch differenziert, 243 G2-Tumore (65,7%) als mäßig differenziert und 85 G3-Tumore (23,0%) als niedrig differenziert, ermittelt werden. 367 aller untersuchten Tumorproben (99,2%) wiesen in der Immunhistochemie LOXL4-Reaktivität auf (*Tabelle 6*).

Tabelle 6: LOXL4-Expression in Abhängigkeit vom Tumor-Grading

		Tumor-Grading			Gesamt [n]
		G1 [n]	G2 [n]	G3 [n]	
LOXL4	negativ	1 (2,4%)	2 (0,8%)	0 (0,0%)	3 (0,8%)
	schwach	39 (92,9%)	168 (69,1%)	38 (44,7%)	245 (66,2%)
	moderat	2 (4,8%)	63 (25,9%)	36 (42,4%)	101 (27,3%)
	stark	0 (0,0%)	10 (4,1%)	11 (12,9%)	21 (5,7%)
Gesamt [n]		42	243	85	370

Bei der statistischen Analyse konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Tumor-Grading und der LOXL4-Expressionsstärke ermittelt werden ($p < 0,001$).

3.2.5 LOXL4-Expression und die Rezidivrate

Ein weiteres Untersuchungsfeld beschäftigte sich mit der Beziehung zwischen dem Vorkommen von Tumorrezidiven und der LOXL4-Expression. Im Hinblick darauf wurden 362 der 390 Tumorproben von Patientinnen mit einem Mammakarzinom fortlaufend untersucht. Hierbei entwickelten 65 Patientinnen (18,0%) ein Tumorrezidiv (*Tabelle 7*).

Tabelle 7: LOXL4-Expression in Abhängigkeit von der Rezidivhäufigkeit

		Rezidiv		Gesamt [n]
		nein [n]	ja [n]	
LOXL4	negativ	8 (2,7%)	1 (1,5%)	9 (2,5%)
	schwach	221 (74,4%)	28 (43,1%)	249 (68,8%)
	moderat	58 (19,5%)	29 (44,6%)	87 (24,0%)
	stark	10 (3,4%)	7 (10,8%)	17 (4,7%)
Gesamt [n]		297	65	362

Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen LOXL4-Expression und rezidivierenden Mammakarzinomen ($p < 0,001$).

3.3 Zusammenhang zwischen LOXL4-Expression und Gesamtüberleben

Als nächstes Kriterium wurde das LOXL4-Protein im Hinblick auf die Überlebensrate der Patientinnen untersucht. In *Tabelle 8* sind die aufgetretenen Todesfälle, die 2-Jahresüberlebensrate, die 5-Jahresüberlebensrate und die mittlere Überlebenszeit in Jahren bei der untersuchten Patientinnen-Kohorte aufgeführt.

Tabelle 8: Überlebensraten beim Mammakarzinom

	Todesfälle [n]	2- Jahres- überlebensrate [%]	5- Jahres- überlebensrate [%]	Mittlere Überlebenszeit [Jahr]
Mamma- karzinom	61 von 390	94,2 ($\pm 1,3$)	82,7 ($\pm 2,5$)	9,56 \pm 0,31

In *Abbildung 4* wurde anschaulich der Verlauf von Überlebenszeiten anhand der Kaplan-Meier-Methode dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass zum Beobachtungsende nach zwölf Jahren die Überlebenswahrscheinlichkeit der an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen bei $\sim 70\%$ lag.

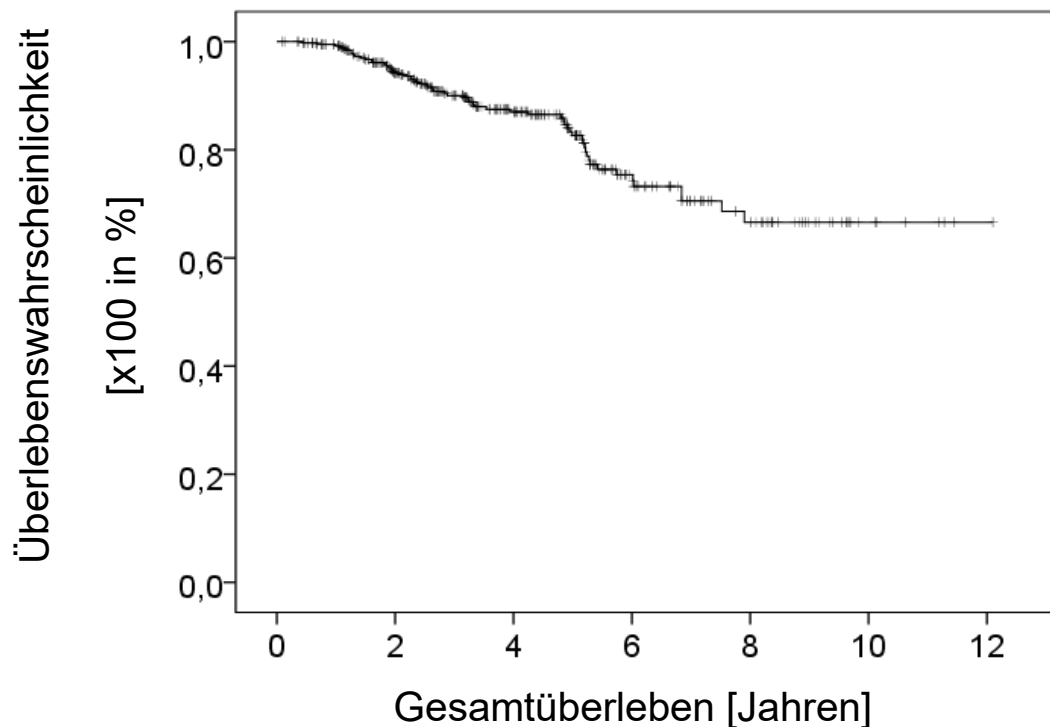


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Überlebenszeit von an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen (Kaplan-Meier-Methode)

Für das Gesamtüberleben einer Patientin sind verschiedene diagnostische Parameter zur Prognosebestimmung von Nöten. Neben dem Tumor-Status, dem Lymphknotenbefall und dem Vorhandensein von Metastasen spielen zusätzlich weitere Faktoren eine wichtige prognostische Rolle. Hierzu gehören der Entartungsgrad des Tumorgewebes (Tumor-Grading), der Hormonrezeptor-Status, der Ki-67-Status und der Her2/neu-Rezeptor-Status. In der vorliegenden Studie wurde die prognostische Wertigkeit von LOXL4 für Mammakarzinom-Patientinnen statistisch analysiert und sowohl mit den Hormonrezeptor(ER und PgG)-Status, als auch dem Her2/neu-Rezeptor-Status, bezogen auf das Gesamtüberleben, verifiziert.

3.3.1 Stadien der LOXL4-Expression in Abhängigkeit vom Gesamtüberleben

Wie in *Tabelle 9* dargestellt, bestand bei steigender LOXL4-Expression eine deutlich schlechtere Prognose für die Patientinnen. Neben der 2-Jahresüberlebensrate und der 5-Jahresüberlebensrate, konnte auch bei der mittleren Überlebenszeit eine prozentual abfallende Tendenz festgestellt werden.

Tabelle 9: Überlebensraten in Abhängigkeit von der LOXL4-Expression

Stadien der LOXL4-Expression	Todesfälle [n]	2- Jahres-überlebensrate [%]	5- Jahres-überlebensrate [%]	Mittlere Überlebenszeit [Jahr]	Log-Rank-Test (<i>p</i>)
negativ	0/9	100	100	(*)	<0,001
schwach	17/255	96,3 (±2,6)	90,0 (±4,8)	10,34±0,28	
moderat	32/105	84,4 (±7,4)	64,4 (±5,5)	8,28±0,53	
stark	12/21	78,9 (±9,4)	35,6 (±9,8)	5,17±0,68	

*) Für LOXL4-negative Patientinnen konnte aufgrund fehlender Todesfälle zum Ende des Untersuchungszeitraums keine mittlere Überlebenszeit in Jahren statistisch errechnet werden.

Zwischen der LOXL4-Expressionsstärke und der Überlebenswahrscheinlichkeit von Mammakarzinom-Patientinnen ließ sich anhand des Log-Rank-Tests ein signifikanter Zusammenhang feststellen ($p < 0,001$).

Für jede der vier LOXL4-Expressionsstadien (negativ; schwach; moderat; stark) wurde eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier erstellt (*Abbildung 5*). Hierbei lag die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit schwacher LOXL4-Expression neun Jahre nach der Operation bei ~80%, von LOXL4 moderaten Patientinnen bei ~45% und von LOXL4 starken Patientinnen bei ~15%.

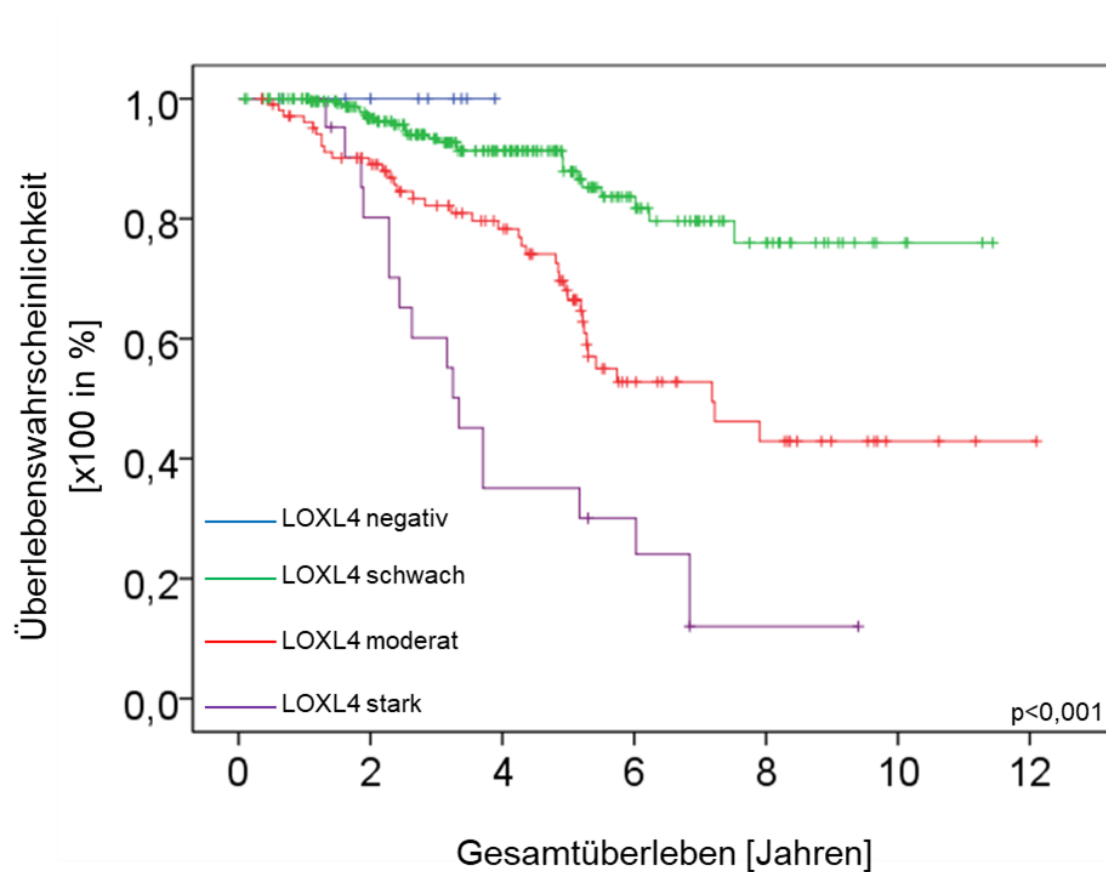


Abbildung 5: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit von verschiedenen LOXL4-Expressionsstadien (Kaplan-Meier-Methode)

3.4 Beziehung zwischen LOXL4-Expression und dem Östrogenrezeptor- bzw. Progesteronrezeptor-Status

Die Hormonrezeptoren für ER und PgR stellen einen wichtigen prognostischen Faktor für den Therapieverlauf der Mammakarzinome dar. Wie in *Tabelle 10* dargestellt, hatten 300 von 386 (77,7%) Mammakarzinom-Proben einen positiven ER-Status. 293 von 386 (75,9%) Proben hatten simultan einen positiven ER-Status und eine positive LOXL4-Expression. Statistisch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem ER-Status ($p=0,016$).

Tabelle 10: LOXL4-Expression in Abhängigkeit vom ER-Status

		ER-Status		Gesamt [n]
		negativ [n]	positiv [n]	
LOXL4	negativ	2 (2,3%)	7 (2,3%)	9 (2,3%)
	schwach	44 (51,2%)	209 (69,7%)	253 (65,5%)
	moderat	34 (39,5%)	69 (23,0%)	103 (26,7%)
	stark	6 (7,0%)	15 (5,0%)	21 (5,4%)
Gesamt [n]		86	300	386

Neben dem ER-Status konnte der statistische Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem PgR-Status bei 385 Mammakarzinom-Proben untersucht werden.

Wie in *Tabelle 11* gezeigt, wurden 244 der 385 (63,3%) Mammakarzinom-Proben auf einen positiven PgR-Status getestet. Von ihnen konnten 239 (62,1%) Proben übereinstimmend als LOXL4 positiv und mit einem positiven PgR-Status ermittelt werden.

Tabelle 11: LOXL4-Expression in Abhängigkeit vom PgR-Status

		PgR-Status		Gesamt [n]
		negativ [n]	positiv [n]	
LOXL4	negativ	4 (2,8%)	5 (2,0%)	9 (2,3%)
	schwach	83 (58,9%)	170 (69,7%)	253 (65,7%)
	moderat	43 (30,5%)	59 (24,2%)	102 (26,5%)
	stark	11 (7,8%)	10 (4,1%)	21 (5,5%)
Gesamt [n]		141	244	385

Anhand der Ergebnisse konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem PgR-Status und der LOXL4-Expression ermittelt werden ($p=0,15$).

Um weitere Angaben über den Zusammenhang zwischen LOXL4 und dem Hormonrezeptor-Status machen zu können, wurde der jeweilige Einfluss vom ER- bzw. PgR-Status auf das Gesamtüberleben statistisch errechnet.

3.4.1 Korrelation zwischen LOXL4-Expressionsstärke und ER-Status in Bezug auf das Gesamtüberleben

Die Auswertung, der in der *Tabelle 12* aufgeführten und in *Abbildung 6* dargestellten Werte, ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem ER-Status und dem Gesamtüberleben ($p < 0,001$).

Tabelle 12: Überlebensraten in Abhängigkeit vom ER-Status

ER-Status	Todesfälle [n]	2- Jahres- überlebensrate [%]	5- Jahres- überlebensrate [%]	Mittlere Überlebenszeit [Jahr]	Log- Rank- Test (p)
Positiv	32 von 300	96,9 ($\pm 1,1$)	88,9 ($\pm 2,4$)	10,27 \pm 0,31	<0,001
Negativ	27/86	87,9 ($\pm 3,6$)	63,7 ($\pm 3,8$)	6,42 \pm 0,46	

Demnach war ein signifikant negativer, prognostischer Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patientinnen mit einem ER-negativen Mammakarzinom erkennbar.

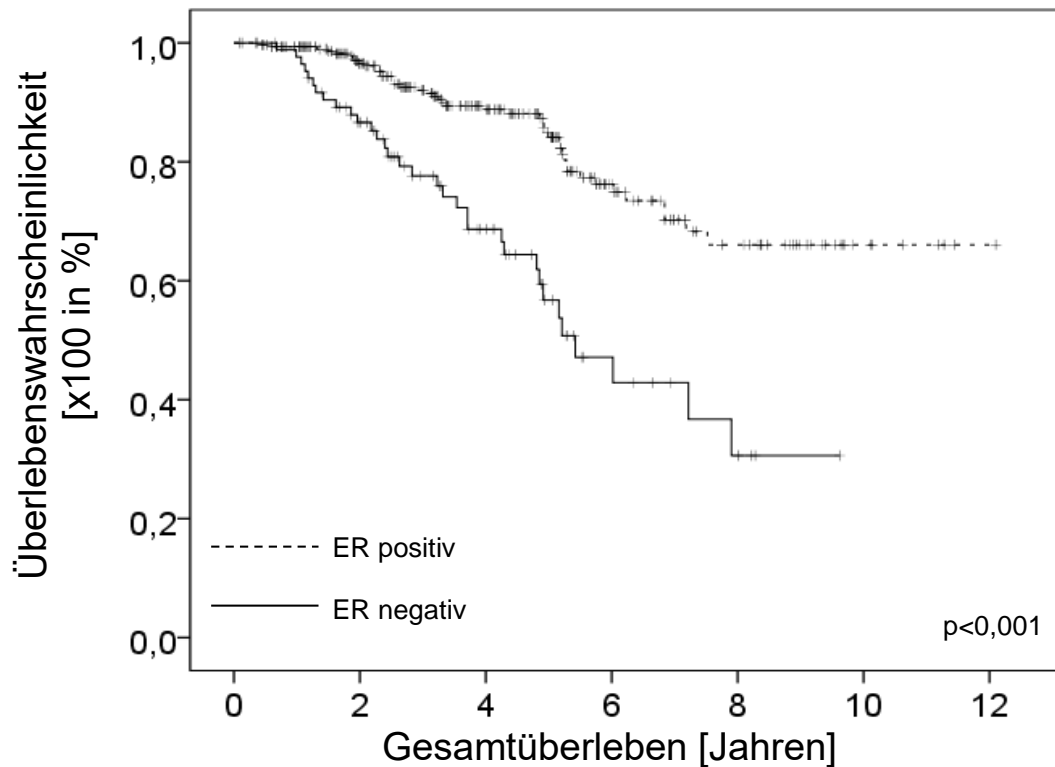


Abbildung 6: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom positiven und negativen ER-Status (Kaplan-Meier-Methode)

Der statistische Vergleich zwischen den einzelnen LOXL4-Expressionsstadien (negativ/schwach/moderat/stark) und ER-Status ergab keinen signifikanten Zusammenhang ($p > 0,05$). Fasst man hingegen das negative und schwache LOXL4-Expressionsstadium zu einer Gruppe (LOXL4 Niedrig) und das moderate und starke Expressionsstadium zu einer weiteren Gruppe (LOXL4 Hoch) zusammen, dann ändern sich die statistischen Verhältnisse aufgrund der höheren Fallzahl.

Die in der *Tabelle 13* aufgeführten Werte machen deutlich, dass vor allem die LOXL4-niedrig Gruppe, im Vergleich zur Patientinnen-Kohorte mit positiven ER-Status, eine deutlich bessere Prognose, bezogen auf das Gesamtüberleben, besitzt. Für diese Gruppe konnte eine mittlere Überlebenszeit von $10,82 \pm 0,25$ Jahren und eine 5-Jahresüberlebensrate von $95,5\% (\pm 1,7\%)$ errechnet werden.

Eine deutlich schlechtere Prognose hingegen besitzt die Gruppe LOXL4 Niedrig/ER negativ, gefolgt von der Gruppe LOXL4 Hoch/ER positiv. Die schlechteste Prognose wies die Gruppe mit hoher LOXL4-Expression und negativem ER-Status auf. Hier lag die mittlere Überlebenszeit lediglich bei $4,86 \pm 0,51$ Jahren und die 5-Jahresüberlebensrate bei nur 43,5% ($\pm 9,8\%$).

Tabelle 13: Überlebensraten in Abhängigkeit von der LOXL4-Expression und dem ER-Status

LOXL4-Expression/ER-Status	Todesfälle [n]	2- Jahres-überlebensrate [%]	5- Jahres-überlebensrate [%]	Mittlere Überlebenszeit [Jahr]	Log-Rank-Test (<i>p</i>)
Niedrig/negativ	8/46	93,1 ($\pm 3,8$)	83,1 ($\pm 7,8$)	$7,61 \pm 0,6$	<0,001
Niedrig/positiv	8/216	98,3 ($\pm 1,0$)	95,5 ($\pm 1,7$)	$10,82 \pm 0,25$	
Hoch/negativ	19/40	82,0 ($\pm 6,2$)	43,5 ($\pm 9,8$)	$4,86 \pm 0,51$	
Hoch/positiv	24/84	93,6 ($\pm 2,8$)	77,7 ($\pm 5,2$)	$8,62 \pm 0,56$	

Der prognostische Charakter von LOXL4 im Zusammenhang mit der Bestimmung des ER-Status, bezogen auf das Gesamtüberleben von Mammakarzinom-Patientinnen, ließ sich demnach als statistisch signifikant absichern ($p < 0,001$).

Abbildung 7 veranschaulicht die Überlebenswahrscheinlichkeit aller in der *Tabelle 13* aufgeführten LOXL4-Gruppen. Die Gruppe LOXL4 Niedrig/ER positiv zeigte die beste Prognose und wies eine Überlebenswahrscheinlichkeit nach acht Jahren von $\sim 80\%$ auf. Die schlechteste Prognose hatte die Gruppe LOXL4 Hoch/ER negativ. Hierbei lag die Überlebenswahrscheinlichkeit nach acht Jahren bei nur $\sim 10\%$.

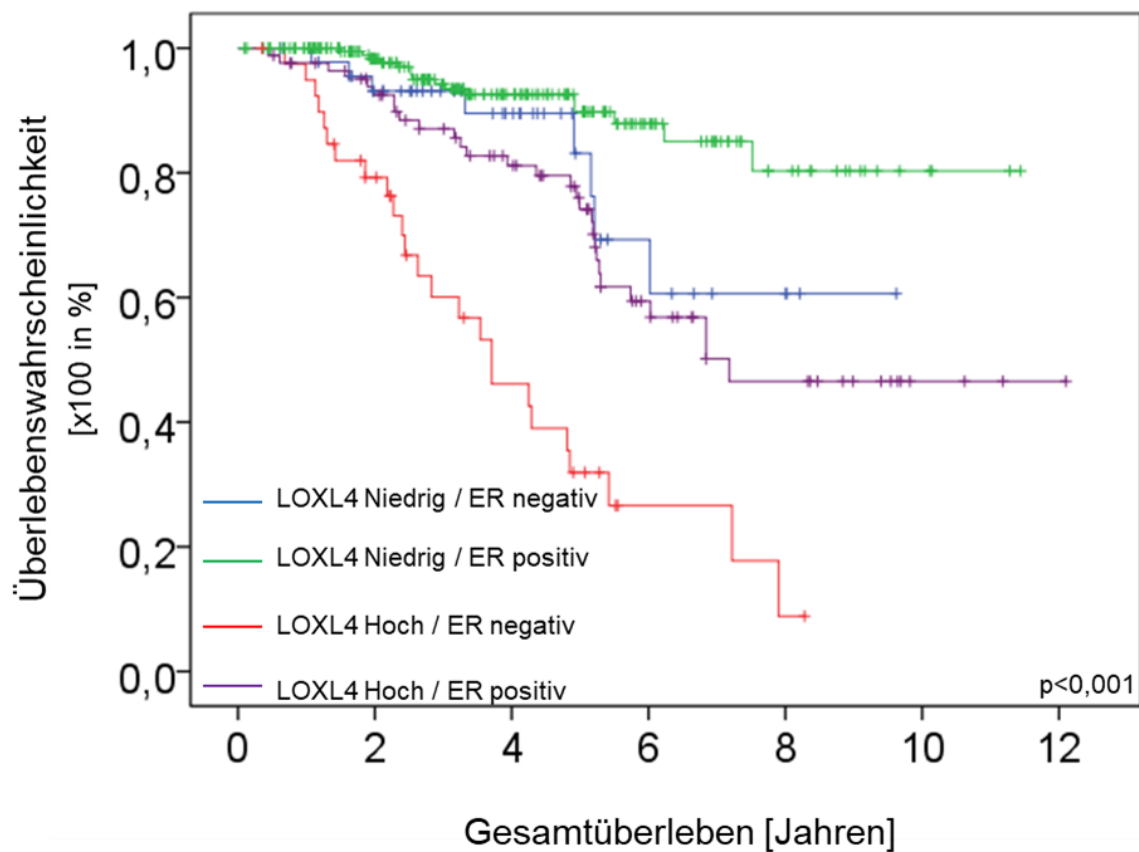


Abbildung 7: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom positiven und negativen ER-Status mit niedriger und hoher LOXL4-Expression (Kaplan-Meier-Methode)

3.4.2 Korrelation zwischen LOXL4-Expressionsstärke und PgR-Status in Bezug auf das Gesamtüberleben

Der zweite prognostische Hormonrezeptor war der PgR. Die klinisch-pathologischen Daten wurden im Hinblick auf das Gesamtüberleben statistisch ausgewertet, wonach Patientinnen mit einem positiven PgR-Status eine bessere Prognose besaßen als PgR-negative Patientinnen (*Tabelle 14*).

Tabelle 14: Überlebensraten in Abhängigkeit vom PgR-Status

PgR-Status	Todesfälle [n]	2- Jahres- überlebensrate [%]	5- Jahres- überlebensrate [%]	Mittlere Überlebens- zeit [Jahr]	Log- Rank- Test (<i>p</i>)
positiv	20/244	97,5 ($\pm 1,1$)	89,7 ($\pm 2,7$)	10,64 \pm 0,32	<0,001
negativ	39/141	90,3 ($\pm 2,6$)	73,0 ($\pm 4,6$)	7,11 \pm 0,38	

Die statistische Auswertung der in der *Tabelle 14* aufgeführten Werte ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem PgR-Status und dem Gesamtüberleben ($p < 0,001$).

Die in der *Abbildung 8* dargestellten Überlebenskurven machen deutlich, dass PgR-positive Patientinnen, insbesondere auf lange Sicht, eine bessere Prognose haben als PgR-negative.

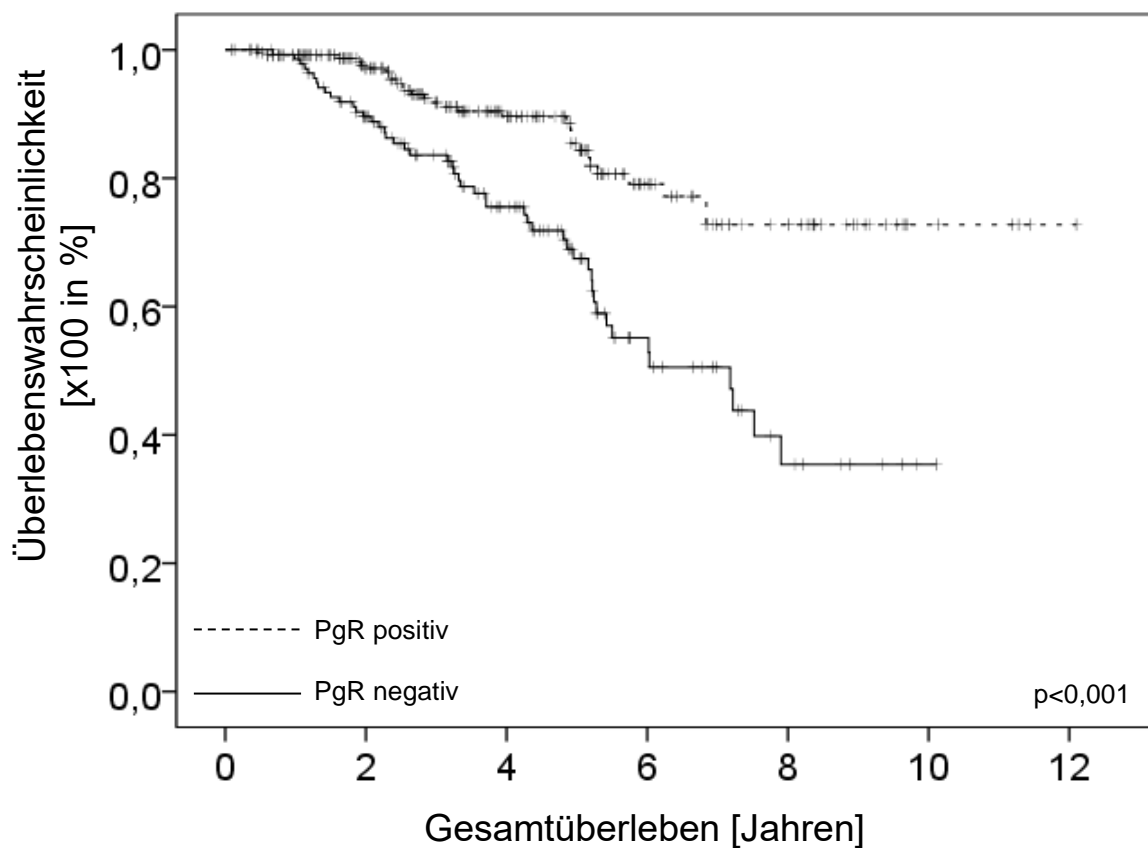


Abbildung 8: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom PgR-Status (Kaplan-Meier-Methode)

Der statistische Vergleich zwischen den einzelnen LOXL4-Expressionsstadien (negativ/schwach/moderat/stark) und dem PgR-Status ergab, ähnlich wie beim ER-Status, keinen signifikanten Zusammenhang ($p > 0,05$). So wurde auch hier aus den LOXL4-negativen und schwach-positiven Proben eine Gruppe (LOXL4 Niedrig) und aus den LOXL4-moderaten und stark-positiven Proben eine Gruppe (LOXL4 Hoch) gebildet. Beide Gruppen wurden mit dem Gesamtüberleben der Mammakarzinom-Patientinnen in Korrelation gesetzt.

Die in der *Tabelle 15* aufgeführten Werte ergaben, dass Patientinnen der Gruppe LOXL4 Niedrig/PgR positiv die beste Prognose aufweisen. Deren mittlere Überlebenszeit betrug $11,07 \pm 0,19$ Jahre und die 5-Jahresüberlebensrate 95,4% ($\pm 2,4\%$). Patientinnen der Gruppe LOXL4 Hoch/PgR negativ hatten hingegen mit einer mittleren Überlebenszeit von $5,10 \pm 0,49$ Jahren und einer 5-Jahresüberlebensrate von 51,0% ($\pm 8,1\%$) die schlechteste Prognose.

Tabelle 15: Überlebensraten in Abhängigkeit von LOXL4-Expression und dem PgR-Status

LOXL4-Expression/PgR-Status	Todesfälle [n]	2- Jahres-überlebensrate [%]	5- Jahres-überlebensrate [%]	Mittlere Überlebenszeit [Jahr]	Log-Rank-Test (<i>p</i>)
Niedrig/ negativ	12/87	93,7 ($\pm 2,7$)	89,3 ($\pm 3,6$)	$8,52 \pm 0,42$	<0,001
Niedrig /positiv	4/75	99,2 ($\pm 0,8$)	95,4 ($\pm 2,4$)	$11,07 \pm 0,19$	
Hoch/ negativ	27/54	84,9 ($\pm 4,9$)	51,0 ($\pm 8,1$)	$5,10 \pm 0,49$	
Hoch/ positiv	16/69	93,7 ($\pm 3,1$)	79,8 ($\pm 5,6$)	$9,16 \pm 0,64$	

Die Abhängigkeit von LOXL4 und dem PgR-Status, gemessen am Gesamtüberleben von Mammakarzinom-Patientinnen, ließ sich signifikant absichern ($p < 0,001$).

Die *Abbildung 9* gibt Auskunft über die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier. Nach zehn Jahren betrug sie für die Gruppe LOXL4 Niedrig/PgR positiv $\sim 85\%$, für die Gruppe LOXL4 Hoch/PgR negativ hingegen $\sim 10\%$.

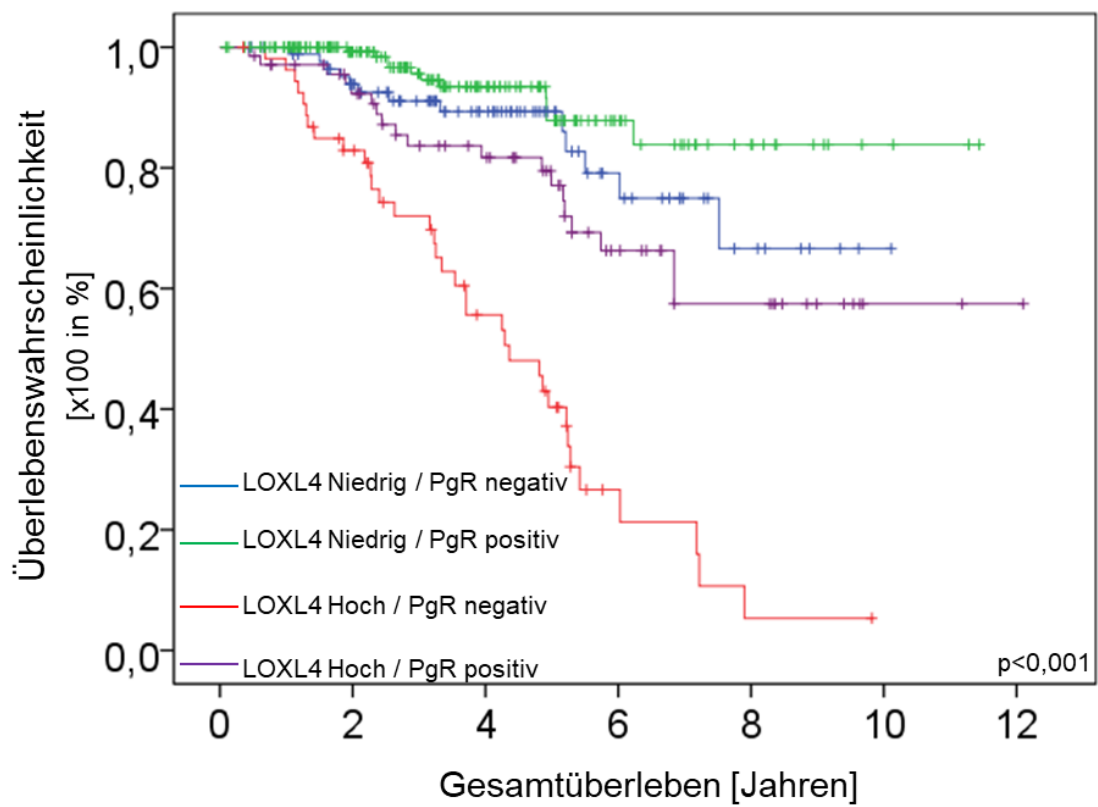


Abbildung 9: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom positiven und negativen PgR-Status mit niedriger und hoher LOXL4-Expression (Kaplan-Meier-Methode)

3.5 Beziehung zwischen der LOXL4-Expression und dem Her2/neu-Rezeptor-Status

Neben dem ER- und dem PgR-Status spielt der Her2/neu-Rezeptor-Status eine weitere wichtige Rolle für die Therapiewahl und die damit einhergehende Überlebensprognose. Der vor der Untersuchung pathologisch bekannte Her2/neu-Rezeptor-Status von 300 Mammakarzinom-Proben wurde in 3 Gruppen eingestuft. Insgesamt 193 Proben (64,3%) wurden als Her2/neu negativ ermittelt, 52 Proben (17,3%) als einfach positiv und 55 Proben (18,3%) als doppelt positiv.

Tabelle 16: LOXL4-Expression in Abhängigkeit vom Her2/neu-Rezeptor-Status

		Her2/neu-Rezeptor-Status			Gesamt [n]
		negativ [n]	positiv [n]	doppelt positiv [n]	
LOXL4	negativ	3 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (1,0%)
	schwach	140 (72,5%)	32 (61,5%)	40 (72,7%)	212 (70,7%)
	moderat	45 (23,3%)	16 (30,8%)	10 (18,2%)	101 (27,3%)
	stark	5 (2,6%)	4 (7,7%)	5 (9,1%)	21 (5,7%)
Gesamt [n]		193	52	55	300

Bei der immunhistochemischen Untersuchung dieser Proben wiesen 297 (99,0%) einen LOXL4-Expression auf. In allen einfach positiven, sowie doppelt positiven Proben konnte übereinstimmend eine positive LOXL4-Expression nachgewiesen werden (*Tabelle 16*). Es konnte anhand der Ergebnisse kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Her2/neu-Rezeptor-Status und der LOXL4-Expression ermittelt werden ($p=0,16$).

3.5.1 Korrelation zwischen LOXL4-Expression und Her2/neu-Rezeptor-Status in Bezug auf das Gesamtüberleben

Die Analyse des dritten prognostischen Tumormarkers (Her2/neu) ergab, dass die Her2/neu-doppelt positiven Patientinnen eine mittlere Überlebenszeit von $8,31 \pm 0,48$ Jahren und eine 5-Jahresüberlebensrate von 93,4% ($\pm 3,7\%$) aufweisen (Tabelle 17). Für die Gruppe der Her2/neu-positiven Patientinnen betrug die mittlere Überlebenszeit $6,71 \pm 0,42$ Jahre und die 5-Jahresüberlebensrate 81,1% ($\pm 7,0\%$).

Durch den Log-Rank-Test konnte eine signifikante Abhängigkeit vom Her2/neu-Rezeptor-Status auf das Gesamtüberleben der Patientinnen ermittelt werden ($p = 0,04$).

Tabelle 17: Überlebensraten in Abhängigkeit vom Her2/neu-Rezeptor-Status

Her2/neu-Rezeptor-Status	Todesfälle [n]	2- Jahres-überlebensrate [%]	5- Jahres-überlebensrate [%]	Mittlere Überlebenszeit [Jahr]	Log-Rank-Test (p)
Negativ	15/193	98,1 ($\pm 1,1$)	88,5 ($\pm 3,4$)	$7,39 \pm 0,25$	0,04
Positiv	10/52	91,7 ($\pm 4,0$)	81,1 ($\pm 7,0$)	$6,71 \pm 0,42$	
doppelt positiv	5/55	100	93,4 ($\pm 3,7$)	$8,31 \pm 0,48$	

Die Relation zwischen Her2/neu-Rezeptor-Status und Überlebensrate lässt sich graphisch in *Abbildung 10* demonstrieren. Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Her2/neu-doppelt positiven Patientinnen lag nach acht Jahren bei $\sim 75\%$, von Her2/neu-negativen Patientinnen bei $\sim 55\%$ und von Her2/neu-positiven Patientinnen bei $\sim 30\%$.

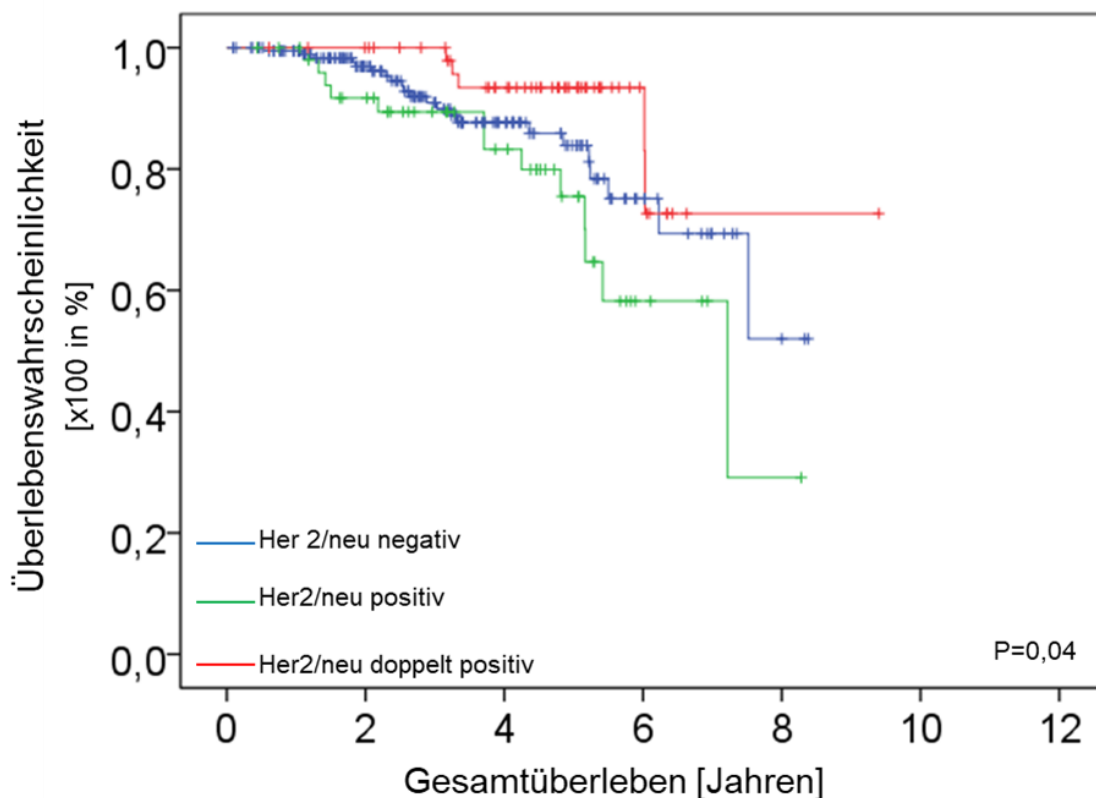


Abbildung 10: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom negativen, positiven und doppelt positiven Her2/neu-Rezeptor-Status (Kaplan-Meier-Methode)

Die in der *Tabelle 17* aufgeführten und in der *Abbildung 10* dargestellten Werte zeigen deutlich, dass die Gruppe der Her2/neu-doppelt positiven Patientinnen die beste Prognose aufwiesen, die Gruppe der Her2/neu-positiven Patientinnen hingegen die Schlechteste.

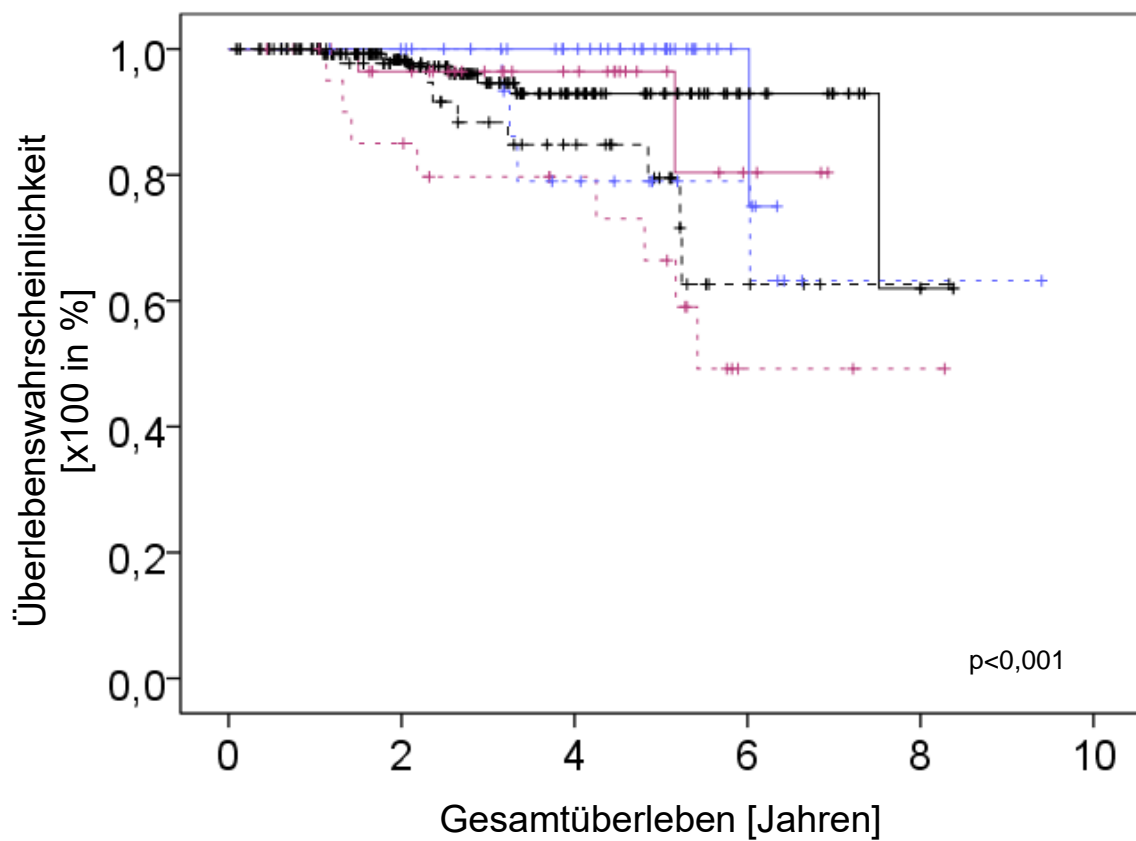
Schließlich wurden die pathologischen Daten des Her2/neu-Rezeptor-Status in Korrelation zu den Gruppen LOXL4 Niedrig (negativ/schwach) und LOXL4 Hoch (moderat/stark) untersucht (*Tabelle 18*). Demnach lag die 5-Jahresüberlebensrate von allen LOXL4-niedrig Patientinnen zwischen 92,9% und 100%, die der LOXL4-hoch Patientinnen zwischen 66,4% und 79,5%.

Tabelle 18: Überlebensraten in Abhängigkeit von der LOXL4-Expression und dem Her2/neu-Rezeptor-Status

LOXL4-Expression/ Her2/neu-Rezeptor-Status	Todesfälle [n]	2- Jahres- überlebensrate [%]	5- Jahres- überlebensrate [%]	Mittlere Überlebenszeit [Jahr]	Log-Rank- Test (<i>p</i>)
Niedrig/negativ	7/144	98,3 ($\pm 1,2$)	92,9 ($\pm 2,9$)	7,70 \pm 0,27	<0,001
Niedrig/positiv	2/32	96,4 ($\pm 3,5$)	96,4 ($\pm 3,5$)	6,45 \pm 0,31	
Niedrig/doppelt positiv	1/39	100	100	6,26 \pm 0,7	
Hoch/negativ	8/50	97,7 ($\pm 2,2$)	79,5 ($\pm 7,9$)	6,73 \pm 0,48	
Hoch/positiv	8/20	85,0 ($\pm 8,0$)	66,4 ($\pm 9,7$)	5,91 \pm 0,64	
Hoch/doppelt positiv	4/15	100	79,0 ($\pm 9,3$)	7,58 \pm 0,76	

Bezogen auf das Gesamtüberleben ließ sich durch den Log-Rank-Test eine signifikante Abhängigkeit von LOXL4-Expressionsstärke und dem Her2/neu-Rezeptor-Status errechnen ($p < 0,001$).

In *Abbildung 11* wurde das Gesamtüberleben in Jahren dargestellt. In dieser Kohorte besaß die Gruppe aus LOXL4 Hoch und positivem Her2/neu-Status die schlechteste Prognose mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von $\sim 50\%$ nach acht Jahren.



- LOXL4 Niedrig / Her2/neu negativ
- LOXL4 Niedrig / Her2/neu positiv
- LOXL4 Niedrig / Her2/neu doppelt positiv
- LOXL4 Hoch / Her2/neu negativ
- LOXL4 Hoch / Her2/neu positiv
- LOXL4 Hoch / Her2/neu doppelt positiv

Abbildung 11: Zeitverlauf von Überlebenskurven in Abhängigkeit vom negativen, positiven und doppelt positiven Her2/neu-Rezeptor-Status mit niedriger und hoher LOXL4-Expression (Kaplan-Meier-Methode)

4. Diskussion

Wie bei den meisten karzinomatösen Erkrankungen, stellen auch beim Mammakarzinom die Tumormarker-Tests eine immer wichtiger werdende diagnostische und prognostische Untersuchungsmöglichkeit dar.

Im Fokus der vorgestellten Arbeit stand die Beurteilung der LOXL4-Expression in Mammakarzinomen mittels immunhistologischer Analysen, im Hinblick auf Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern. Die vermehrte Expression von LOXL4 konnte an einer statistisch relevanten Anzahl von 390 Mammakarzinom-TMAs bestimmt werden. Der ausführlichen und umfangreichen statistischen Auswertung stand eine Datenbank mit den jeweiligen klinisch-pathologischen Befunden und kompletten Follow-Up-Daten zur Verfügung. Das mediane Alter der untersuchten Patientinnen lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 59,29 Jahren und somit unterhalb des mittleren Erkrankungsalters in Deutschland, welches bei 64,3 Jahren liegt (RKI 2016).

Die immunhistologischen Untersuchungen erlaubten, statistische Korrelationen zwischen einzelnen klinisch-pathologischen Parametern und der LOXL4-Expression zu erstellen. Zu denen, in die Statistik einfließenden Parametern, zählten der Tumor-Status, der Nodal-Status, der Metastasen-Status, das Tumor-Grading, die Rezidivrate, die Hormonrezeptor-Status, sowie der Her2/neu-Rezeptor-Status. Bei den Untersuchungen lag, neben der Bestimmung des Gesamtüberlebens von Mammakarzinom-Patientinnen, ein besonderes Augenmerk auf der Bestimmung von Korrelationen zwischen dem Gesamtüberleben und der LOXL4-Expression, sowie auf der Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben und der LOXL4-Expression im Zusammenspiel mit den Hormonrezeptor-Status und dem Her2/neu-Rezeptor-Status.

4.1 LOXL4 und das Mammakarzinom

In vorangegangenen Studien wurden teilweise kontroverse Ergebnisse über die Expression von LOXL4 und deren pathophysiologischen Bedeutung bei karzinomatösen Erkrankungen erzielt.

Die molekulare Bedeutung von LOXL4 bei der Tumordinvasion wurde zuerst an Mammakarzinom-Zellen untersucht (Kirschmann *et al.* 2002). Die Autoren konnten darlegen, dass in einer Kollagen/Laminin-Gelatinmatrix das Wachstum der Karzinomzellen durch Transfektion mit LOXL4-genspezifischen Antisense-Oligonukleotiden stark inhibiert wurde. Die vorliegende Studie hat wesentlich dazu beigetragen, die von Kirschmann und Mitarbeiter gezeigte Überexpression des LOXL4-Gens in Mammakarzinom-Zellen *in-vitro*, auf immunhistochemischer Ebene mit statistisch repräsentativen Mammakarzinom-Biopsaten zu verifizieren. Auch Studien an Kopf-Hals-Karzinomen und kolorektalen Adenokarzinomen berichten von einer signifikanten Korrelation von erhöhter LOXL4-Expression mit aggressivem Tumorstadium und gesteigerter Metastasierungsneigung (Holtmeier *et al.* 2003, Görögh *et al.* 2007, Weise *et al.* 2008, Kim *et al.* 2009).

Die Expression von LOX in malignen Tumoren wird kontrovers diskutiert (Erlinger *et al.* 2006). Es existieren Studien, die auf den Zusammenhang zwischen LOXL4-Expression und Tumorsuppression hindeuten. Bei Untersuchungen von Mamma-, Lungen- und Prostatakarzinomen konnte ein tumorsuppressiver Charakter des Lysyloxidase-Propeptids, einer Vorstufe des LOXL4-Peptids, beschrieben werden (Min *et al.* 2007, Sanchez-Morgan *et al.* 2011, Bais *et al.* 2012, Bais *et al.* 2015, Ozdener *et al.* 2016). Die Hemmung der Zellmigration und Zellproliferation, sowie die korrelierende Erhöhung der Apoptoserate bei erhöhten Lysyloxidase-Propeptid-Expressionsraten, spielen eine wesentliche, tumorsuppressive Rolle und konnten auch an hepatozellulären Karzinomen nachgewiesen werden (Zheng *et al.* 2014). Des Weiteren fanden Wu und Mitarbeiter verringerte Expressionsraten von LOXL1 und LOXL4 bei invasiven Blasenkarzinomen (Wu *et al.* 2007). Aufgrund

von Genmethylierung und somatischen Mutationen, verbunden mit der Hemmung von onkogenetischen Signalwegen, schrieben die Autoren LOXL1 und LOXL4 ebenfalls einen tumorsuppressiven Charakter zu. Ähnliche Befunde über das LOXL4-Peptid und dessen tumorsuppressiver Eigenschaft konnten anhand von Untersuchungen an hepatozellulären Karzinomen und Triple-Negativen Mammakarzinomen gewonnen werden (Tian *et al.* 2015, Choi *et al.* 2017). Unsere Ergebnisse stehen hierzu im Gegensatz und untermauern die im Jahre 2002, 2008 und 2015 gewonnenen Ergebnisse an Mammakarzinomen und Kopf-Hals-Karzinomen (Kirschmann *et al.* 2002, Weise *et al.* 2008, Diercks and Görögh 2015). In der vorliegenden Studie konnten insgesamt 377 von 379 Karzinom-Biopsaten (99,5%) in unterschiedlicher Intensität immunhistochemisch angefärbt und ausgewertet werden.

4.2 Diagnostische Wertigkeit der LOXL4-Expression

4.2.1 Tumor-Status, Nodal-Status, Metastasen-Status

Zur Überprüfung der prognostisch-diagnostischen Wertigkeit des LOXL4-Proteins wurde dessen Expressionsstärke in Korrelation mit dem Prognosefaktor Tumor-Status, und weiteren klinisch-pathologischen Parametern, wie dem Nodal-Status und dem Metastasen-Status untersucht. Vorläuferstudien beschäftigten sich mit dem invasiven und metastasierenden Wachstumsverhalten von Mammakarzinomen und deren Zusammenspiel mit erhöhten LOXL4-Gen-Expressionswerten (Kirschmann *et al.* 2002).

Die Korrelation zwischen erhöhten LOXL4-Expressionswerten und dem progressiven Wachstums- und Metastasierungsverhalten konnte durch Gabe eines LOX-Inhibitors (Beta-Aminopropionitril) und durch Gabe eines HIF-Inhibitors nachgewiesen werden (Kirschmann *et al.* 2002, Wong *et al.* 2012). Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ließ sich der Zusammenhang von erhöhten LOXL4-

Expressionswerten und dem invasiven und metastasierenden Wachstumsverhalten darstellen. Es sollte auch nicht unerwähnt bleiben, dass neben einem statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem Tumorstadium, auch eine signifikante Korrelation der LOXL4-Expression mit dem Nodal-Status und dem Metastasen-Status, anhand des Chi-Quadrat-Tests, verifiziert werden konnte ($p < 0,001$). Ähnliche Untersuchungen wurden an Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes durchgeführt (Görögh *et al.* 2007), jedoch ließ sich keine statistische Evidenz für einen signifikanten Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem Nodal-Status, Metastasen-Status und dem Tumor-Grading nachweisen (Weise *et al.* 2008).

4.2.2 Tumor-Grading

Bei karzinomatösen Erkrankungen ist der Grad der Abweichung vom gesunden Brustgewebe ein wichtiger prognostischer Faktor und liefert Informationen über die Proliferationsneigung und den aggressiven Charakter eines Mammakarzinoms (Elston and Ellis 1991, Kollias *et al.* 1997, Elston and Ellis 2002). Bis zum heutigen Zeitpunkt ist uns keine Literatur bekannt, die die Beziehung zwischen LOXL4 und dem Tumor-Grading beim Mammakarzinom beschreibt. Im Jahre 2008 beschäftigten sich Weise und Mitarbeiter bei ihren Untersuchungen von 232 Kopf-Hals-Karzinom-Biopsaten mit dieser Fragestellung, sie fanden jedoch keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem Entartungsgrad (Weise *et al.* 2008). In der vorliegenden Studie konnte anhand des Chi-Quadrat-Tests eine signifikante Korrelation zwischen der LOXL4-Expression und dem Entartungsgrad nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Immunhistologisch wiesen 99,2% aller untersuchten Tumorproben mit bekanntem Entartungsgrad eine LOXL4-Reaktivität auf.

4.2.3 Rezidivrate

Zu den richtungsweisenden, klinischen Parametern zählt zudem die Rezidivrate. Mittels Bestimmung des individuellen Genexpressionsprofils bestimmter Mammakarzinom-Subtypen können Risikopatienten ermittelt werden. Verschiedene Studien legen dar, dass der Triple-Negative Brustkrebs-Subtyp die schlechteste Prognose mit erhöhter Rezidivrate besitzt (Dent *et al.* 2007, Voduc *et al.* 2010, Leidy *et al.* 2014). Ebenso wie beim Entartungsgrad handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste Studie, die sich mit dem Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und der Rezidivrate beim Mammakarzinom beschäftigte. Eine Korrelation zwischen der Rezidivrate und der erhöhten LOXL4-Expression konnte statistisch signifikant bestätigt werden ($p < 0,001$).

In Anbetracht der Auswertung der Ergebnisse könnte LOXL4 zur Bestimmung des Rezidivrisikos zukünftig eine wichtige Rolle in der Diagnostik einnehmen und somit auch prognostische Aussagekraft bekommen. Eine kontrovers zu diskutierende Studie wurde im Jahre 2015 von Tian und Mitarbeitern veröffentlicht, in der die Autoren über den Tumor-suppressiven Charakter von LOXL4 an einer wissenschaftlich aussagekräftigen Kohorte von insgesamt 298 Hepatozellulärem Karzinom berichten. In diesem Fall hatte eine schwache LOXL4-Expression eine negative Auswirkung auf die Rezidivrate und das Gesamtüberleben der Patienten (Tian *et al.* 2015).

4.2.4 Hormonrezeptor-Status, Her2/neu-Rezeptor-Status

Das Mammakarzinom ist eine systemisch metastasierende und biologisch heterogene Erkrankung. Es wird in fünf molekulare Subtypen eingeteilt, wobei der Bestimmung des Hormonrezeptor-Status (ER und PgR), des Her2/neu-Rezeptor-Status, dem Tumor-Grading und der Ki-67-Proliferationsrate eine entscheidende prognostische Rolle zukommt (Goldhirsch *et al.* 2011, Vasconcelos *et al.* 2016).

Sie beschreiben die biologische Beschaffenheit der Tumorzellen und lassen die Aggressivität des Tumors besser einschätzen. So gewinnen prognostische und prädiktive Faktoren bei der individualisierten Therapie des Mammakarzinoms zunehmend an Bedeutung (Stickeler and Schneeweiss 2013). Beispielsweise dient der Hormonrezeptor als hervorragender prädiktiver Marker für das Ansprechen einer antihormonellen Therapie. Dabei ist der ER-Status bei ~70% der an Brustkrebs erkrankten Patientinnen positiv (Dowsett *et al.* 2006, Lumachi *et al.* 2013). Der Her2/neu-Rezeptor-Status stellt einen weiteren wichtigen prognostischen und prädiktiven Faktor dar. Bei ~25-30% der Mammakarzinome liegt eine Her2/neu-Überexpression vor, die mit einer schlechten Prognose einhergeht (Rasmussen *et al.* 2008).

Bislang gibt es keine wissenschaftlichen Befunde, die den Stellenwert von LOXL4 im Zusammenhang mit dem Hormonrezeptor-Status, sowie dem Her2/neu-Rezeptor-Status, beleuchten. Bei Betrachtung der Analysenergebnisse konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem ER-Status und der LOXL4-Expression ermittelt werden ($p=0,013$). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und dem PgR-Status, sowie dem Her2/neu-Rezeptor-Status ließ sich jedoch nicht nachweisen ($p=0,144$; $p=0,156$).

4.3 Prognostische Wertigkeit der LOXL4-Expression

4.3.1 LOXL4-Expressionsstärke und das Gesamtüberleben

Seit der Erstbeschreibung des invasiven Charakters der LOX-Familie durch Kirschmann und Mitarbeiter im Jahre 2002, lag bis vor kurzem keine Arbeit über die prognostische Bedeutung der LOXL4-Expression beim Mammakarzinom vor (Kirschmann *et al.* 2002). Im Jahre 2015 konnten Tian und Mitarbeiter einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer niedrigen LOXL4-Expression und einem verringertem Gesamtüberleben bei 298 hepatozellulären Karzinomen

beschreiben (Tian *et al.* 2015). Ähnliche Ergebnisse, die LOXL4 als Tumorsuppressorgen bewerten, konnten zwei Jahre später bei einer Kohorte von 584 Mammakarzinomen beschrieben werden (Choi *et al.* 2017). Unsere Befunde stehen zu den Ergebnissen von Tian und Mitarbeitern, sowie Choi und Mitarbeiter im Widerspruch. Die 5-Jahresüberlebensrate, der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientinnen, lag bei 82,7% und somit etwas geringer, als der derzeitige, deutschlandweite Durchschnitt mit 88%. Die 10-Jahresüberlebensrate der Patientinnen-Kohorte lag bei ~70% und somit ebenfalls deutlich unterhalb des durch das RKI statistisch erhobene Durchschnittswerts in Deutschland von 82% (RKI 2016). Diese Abweichungen der hier ermittelten Ergebnisse, verglichen mit den aktuellen Überlebensdaten des RKIs, lassen sich voraussichtlich mit dem zurückliegenden Untersuchungszeitraum der untersuchten Patientinnen-Kohorte zwischen den Jahren 1997 bis 2010 und den seitdem verbesserten Diagnose- und Therapiemöglichkeiten erklären. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Kaplan-Meier-Analyse eine signifikante Korrelation zwischen der LOXL4-Expression und dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden, die durch den Log-Rank-Test mit einem Wert von $p < 0,001$ verifiziert wurde. LOXL4-niedrige Mammakarzinom-Patientinnen haben eine 5-Jahresüberlebensrate von 90,0%, LOXL4-hoch Patientinnen von nur 64,4%. Schlussfolgernd haben prognostisch ungünstige Mammakarzinom-Erkrankungen laut unserer Studie statistisch signifikant erhöhte LOXL4-Expressionwerte.

Aus diesem Grund bleibt die Rolle von LOXL4 und dessen Bedeutung für den klinisch-prognostischen Verlauf von Mammakarzinom-Erkrankungen widersprüchlich. Als mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten unterschiedliche mikroskopische Auswertungsstandards sein. Des Weiteren könnten die Abweichungen bei den Ergebnissen in den verschiedenen Studien anhand des verwendeten LOXL4-Antikörpers begründet sein, die gegen verschiedene Epitope desselben Antigens gerichtet sind. Da die einzelnen LOX-Isoformen hochgradige Sequenzhomologien aufweisen, kann ein anti-LOX-

Antikörper durchaus verschiedene LOX-Isoformen erkennen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der ausschließlich eine spezifische LOXL4-Sequenz erkennt und mit keiner anderen LOX-Isoform interagiert.

4.3.2 LOXL4-Expression in Korrelation mit dem Hormonrezeptor-Status, bzw. Her2/neu-Rezeptor-Status und das Gesamtüberleben

Die Auswirkung eines positiven Hormonrezeptor-Status auf das Gesamtüberleben konnte in verschiedenen Studien unlängst beschrieben werden (Dowsett *et al.* 2010, Bulut and Altundag 2015). Hierbei dienen ER und PgR nicht nur als prognostische Marker, sondern auch als therapeutisches Ziel verschiedener endokriner Therapieverfahren (Kaufmann and Rody 2009, Lonning 2012, Yang *et al.* 2012, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2015). Gleiches gilt auch für den Her2/neu-Rezeptor-Status. Mehrere Studien konnten belegen, dass beim Mammakarzinom die Her2/neu-Überexpression mit fortgeschrittenen Krankheitsverläufen und einem schlechten Gesamtüberleben korreliert (Slamon *et al.* 1987, Dawood *et al.* 2010, Mendes *et al.* 2015).

Um eine genauere Aussage über die prognostische Auswirkung auf das Gesamtüberleben der Patientinnen beim Mammakarzinom zu treffen, stand im weiteren Fokus der Untersuchung die Frage, inwiefern die LOXL4-Expression in Abhängigkeit mit den Prognosefaktoren ER-, PgR- und Her2/neu-Rezeptor-Status eine Auswirkung auf das Gesamtüberleben besitzt. Im Hinblick auf diese Fragestellung gewinnen die in dieser Arbeit erzielten Befunde eine besondere Bedeutung, da in der Literatur bis zum heutigen Zeitpunkt keine vergleichbaren Untersuchungen bekannt sind. Anhand der statistischen Auswertung ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem ER-Status und der LOXL4-Expressionsstärke, bezogen auf das Gesamtüberleben, feststellen ($p < 0,001$). Das Gesamtüberleben verschlechterte sich eindeutig bei den LOXL4-hoch Gruppen.

Die 5-Jahresüberlebensrate lag bei ER-positiven Mammakarzinomen bei 88,9%, bei LOXL4-hoch und ER-positive Mammakarzinom-Patientinnen bei nur 77,7%. Die Gruppe um LOXL4-hoch und ER-negativen Mammakarzinomen hatte bei der statistischen Analyse die schlechteste Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 43,5%. Zusätzlich konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der LOXL4-Expression und dem PgR-Status ($p < 0,001$), sowie dem Her2/neu-Rezeptor-Status ($p = 0,04$) mit dem Gesamtüberleben ermittelt werden. Auch hier bestand bei genauerer Betrachtung eine schlechtere Prognose bei LOXL4-hoch Patientinnen. Besonders deutlich zeigt sich dies bei der Gruppe mit LOXL4-hoch und PgR-negativen Mammakarzinomen mit einer 5-Jahresüberlebensrate von nur noch 51%, verglichen mit der Untersuchungsgruppe PgR negativ mit 73,0%. Gleiches gilt für LOXL4-hoch und Her2/neu-positive Mammakarzinome mit einer 5-Jahres-überlebensrate von 66,4%. Im Gegensatz dazu lag die 5-Jahresüberlebensrate bei Patientinnen mit einem positiven Her2/neu-Rezeptor-Status bei 81,1%.

Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass eine immunhistochemische Erhebung der LOXL4-Expressionsstärke eine bessere prognostische Bewertung der Mammakarzinom-Erkrankung ermöglicht. LOXL4 könnte somit als prognostischer Tumormarker bei der standardisierten Brustkrebs-Diagnostik berücksichtigt werden. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass trotz zunehmender Bedeutung der Immunhistologie in der pathologischen Diagnostik, die Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen noch weiterer spezieller zytopathologischer Kenntnisse, sowie einer Differentialdiagnostik bedarf.

An dieser Stelle sei noch anzumerken, dass LOXL4 auch als „Target“ für gezielte Therapieformen dienen könnte. Diese Annahme stützt sich auf eine kürzlich erschienene Arbeit, die vom therapeutischen Effekt eines monoklonalen anti-LOXL4-Antikörpers bei in-vitro Untersuchungen und im SCID-Maus Tumor-Xenograft-Modell berichtet (Görögh *et al.* 2016). Insgesamt betrachtet, stellt die LOXL4-Expression beim Mammakarzinom, anhand der in dieser Arbeit

ermittelten Daten, eine Bereicherung der prognostisch-diagnostischen Möglichkeiten dar.

5. Zusammenfassung

Wie bei den meisten karzinomatösen Erkrankungen, stellen auch beim Mammakarzinom die Tumormarker-Tests eine zunehmend wichtigere diagnostische und prognostische Untersuchungsmöglichkeit dar. Der Schwerpunkt der vorliegenden Studie lag auf dem immunhistochemischen Nachweis der LOXL4-Expression bei Mammakarzinomen und ihrer prognostisch-diagnostischen Aussagekraft als Tumormarker.

Der immunhistochemischen Analyse der LOXL4-Expression stand eine Kohorte von 390 pathologisch gesicherten Tumorproben von an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen und deren klinisch-pathologischen Daten zur Verfügung. Die statistische Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test, Likelihood-Quotient, Log-Rang-Test sowie der Kaplan-Meier-Methode. Insgesamt wiesen 99,5% der primären Mammakarzinome LOXL4-Expression in unterschiedlicher Ausprägung auf. Zusätzlich konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der LOXL4-Expression und den pathologischen Parametern Tumor-Status ($p<0,001$), Nodal-Status ($p<0,001$), Metastasen-Status ($p<0,001$), Tumorgrading ($p<0,001$), Rezidivrate ($p<0,001$) und Östrogen-Rezeptor-Status ($p=0,016$) verifiziert werden. Die LOXL4-Expression hatte eine signifikante Auswirkung auf das Gesamtüberleben von Mammakarzinom-Patientinnen ($p<0,001$). Gleichmaßen konnte eine signifikante Korrelation zwischen der LOXL4-Expression und dem ER-Status, PgR-Status und dem Her2/neu-Rezeptor-Status, bezogen auf das Gesamtüberleben ermittelt werden ($p<0,001$).

Der prognostisch-diagnostische Wert des LOXL4-Antigens als eigenständiger Tumormarker konnte in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Damit könnte der immunhistochemische Nachweis von LOXL4 als geeignetes Instrument die selektive Bestimmung von Hochrisiko-Patienten und die Bewertung der Tumoraggressivität eines Mammakarzinoms zukünftig verbessern.

6. Literaturverzeichnis

Akiri, G., E. Sabo, H. Dafni, Z. Vadasz, Y. Kartvelishvily, N. Gan, O. Kessler, T. Cohen, M. Resnick, M. Neeman, G. Neufeld (2003). "Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo." *Cancer Res* 63(7): 1657-1666.

Anothaisintawee, T., C. Wiratkapun, P. Lerdsitthichai, V. Kasamesup, S. Wongwaisayawan, J. Srinakarin, S. Hirunpat, P. Woodtichartpreecha, S. Boonlikit, Y. Teerawattananon, A. Thakkinstian (2013). "Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis." *Asia Pac J Public Health* 25(5): 368-387.

Asuncion, L., B. Fogelgren, K. S. Fong, S. F. Fong, Y. Kim, K. Csiszar (2001). "A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain." *Matrix Biol* 20(7): 487-491.

Bais, M. V., M. A. Nugent, D. N. Stephens, S. S. Sume, K. H. Kirsch, G. E. Sonenshein, P. C. Trackman (2012). "Recombinant lysyl oxidase propeptide protein inhibits growth and promotes apoptosis of pre-existing murine breast cancer xenografts." *PLoS One* 7(2): e31188.

Bais, M. V., G. B. Ozdener, G. E. Sonenshein, P. C. Trackman (2015). "Effects of tumor-suppressor lysyl oxidase propeptide on prostate cancer xenograft growth and its direct interactions with DNA repair pathways." *Oncogene* 34(15): 1928-1937.

Barker, H. E., T. R. Cox, J. T. Erler (2012). "The rationale for targeting the LOX family in cancer." *Nat Rev Cancer* 12(8): 540-552.

Beral, V., C. Million Women Study (2003). "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study." *Lancet* 362(9382): 419-427.

Bjorkman, N., G. Bloom (1957). "On the fine structure of the foetal-maternal junction in the bovine placentome." *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 45(6): 649-659.

Bloom, H. J., W. W. Richardson (1957). "Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years." *Br J Cancer* 11(3): 359-377.

Britt, K. (2012). "Menarche, menopause, and breast cancer risk." *Lancet Oncol* 13(11): 1071-1072.

Britt, K., R. Short (2012). "The plight of nuns: hazards of nulliparity." *Lancet* 379(9834): 2322-2323.

Brown, R. H. (1995). "Free radicals, programmed cell death and muscular dystrophy." *Curr Opin Neurol* 8(5): 373-378.

Brown, R. W., R. Chirala (1995). "Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry." *Mod Pathol* 8(5): 515-520.

Bulut, N., K. Altundag (2015). "Does estrogen receptor determination affect prognosis in early stage breast cancers?" *Int J Clin Exp Med* 8(11): 21454-21459.

Chang-Claude, J., N. Eby, M. Kiechle, G. Bastert, H. Becher (2000). "Breastfeeding and breast cancer risk by age 50 among women in Germany." *Cancer Causes Control* 11(8): 687-695.

Choi, S. K., H. S. Kim, T. Jin, W. K. Moon (2017). "LOXL4 knockdown enhances tumor growth and lung metastasis through collagen-dependent extracellular matrix changes in triple-negative breast cancer." *Oncotarget* 8: 11977-11989.

Csiszar, K. (2001). "Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70: 1-32.

Dawood, S., K. Broglio, A. U. Buzdar, G. N. Hortobagyi, S. H. Giordano (2010). "Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review." *J Clin Oncol* 28(1): 92-98.

Dent, R., M. Trudeau, K. I. Pritchard, W. M. Hanna, H. K. Kahn, C. A. Sawka, L. A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun, S. A. Narod (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence." *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4429-4434.

Destatis (2017). Todesursachen in Deutschland 2015. 4, 4-6, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.

Diercks, I., T. Görögh (2015). "Immunohistochemical analysis of clinical and pathological relevance of LOXL4- and survivin expressions in oropharyngeal carcinomas." *Oral Oncol* Volume 51(5): e49.

Dowsett, M., J. Cuzick, J. Ingle, A. Coates, J. Forbes, J. Bliss, M. Buyse, M. Baum, A. Buzdar, M. Colleoni, C. Coombes, C. Snowdon, et al. (2010). "Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen." *J Clin Oncol* 28(3): 509-518.

Dowsett, M., J. Houghton, C. Iden, J. Salter, J. Farndon, R. A'Hern, R. Sainsbury, M. Baum (2006). "Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status." *Ann Oncol* 17(5): 818-826.

Drukker, C. A., J. M. Bueno-de-Mesquita, V. P. Retel, W. H. van Harten, H. van Tinteren, J. Wesseling, R. M. Roumen, M. Knauer, L. J. van 't Veer, G. S. Sonke, E. J. Rutgers, M. J. van de Vijver, et al. (2013). "A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study." *Int J Cancer* 133(4): 929-936.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. (2015). "Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials." *Lancet* 386(10001): 1341-1352.

Elston, C. W., I. O. Ellis (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." *Histopathology* 19(5): 403-410.

Elston, C. W., I. O. Ellis (2002). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." *Histopathology* 41(3A): 154-161.

Erler, J. T., K. L. Bennewith, M. Nicolau, N. Dornhofer, C. Kong, Q. T. Le, J. T. Chi, S. S. Jeffrey, A. J. Giaccia (2006). "Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis." *Nature* 440(7088): 1222-1226.

Filipits, M., M. Rudas, R. Jakesz, P. Dubsy, F. Fitzal, C. F. Singer, O. Dietze, R. Greil, A. Jelen, P. Sevela, C. Freibauer, V. Muller, et al. (2011). "A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors." *Clin Cancer Res* 17(18): 6012-6020.

Goldhirsch, A., W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, B. Thurlimann, H. J. Senn, m. Panel (2011). "Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011." *Ann Oncol* 22(8): 1736-1747.

Görögh, T., C. Holtmeier, J. B. Weise, M. Hoffmann, P. Ambrosch, M. Laudien, K. Csiszar (2008). "Functional analysis of the 5' flanking domain of the LOXL4 gene in head and neck squamous cell carcinoma cells." *Int J Oncol* 33(5): 1091-1098.

Görögh, T., E. S. Quabius, H. Heidebrecht, A. Nagy, T. Muffels, J. Haag, P. Ambrosch, M. Hoffmann (2016). "Lysyl oxidase like-4 monoclonal antibody demonstrates therapeutic effect against head and neck squamous cell carcinoma cells and xenografts." *Int J Cancer* 138(10): 2529-2538.

Görögh, T., J. B. Weise, C. Holtmeier, P. Rudolph, J. Hedderich, S. Gottschlich, M. Hoffmann, P. Ambrosch, K. Csiszar (2007). "Selective upregulation and amplification of the lysyl oxidase like-4 (LOXL4) gene in head and neck squamous cell carcinoma." *J Pathol* 212(1): 74-82.

Hamajima, N., K. Hirose, K. Tajima, T. Rohan, E. E. Calle, C. W. Heath, Jr., R. J. Coates, J. M. Liff, R. Talamini, N. Chantarakul, S. Koetsawang, D. Rachawat, et al. (2002). "Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease." *Br J Cancer* 87(11): 1234-1245.

Harbeck, N., C. Thomssen, M. Gnant (2013). "St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion." *Breast Care (Basel)* 8(2): 102-109.

Hauner, D., W. Janni, B. Rack, H. Hauner (2011). "The effect of overweight and nutrition on prognosis in breast cancer." *Dtsch Arztebl Int* 108(47): 795-801.

Holtmeier, C., T. Gorogh, U. Beier, J. Meyer, M. Hoffmann, S. Gottschlich, K. Heidorn, P. Ambrosch, S. Maune (2003). "Overexpression of a novel lysyl oxidase-like gene in human head and neck squamous cell carcinomas." *Anticancer Res* 23(3B): 2585-2591.

Hsu, S. M., L. Raine, H. Fanger (1981). "The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics." *Am J Clin Pathol* 75(6): 816-821.

Inumaru, L. E., E. A. Silveira, M. M. Naves (2011). "[Risk and protective factors for breast cancer: a systematic review]." *Cad Saude Publica* 27(7): 1259-1270.

Kaplan, E. L., Meier, P. (1958). "Nonparametric estimation from incomplete observation." *J. Am. Stat. Assoc.* 53: 457-481.

Kaufmann, M., R. Rody (2009). "Breast cancer: reduced mortality by early detection and adjuvant therapy." *Geburtshilfe Frauenheilkd* 69: 218-232.

Kim, Y., S. Roh, J. Y. Park, Y. Kim, D. H. Cho, J. C. Kim (2009). "Differential expression of the LOX family genes in human colorectal adenocarcinomas." *Oncol Rep* 22(4): 799-804.

Kirschmann, D. A., E. A. Seftor, S. F. Fong, D. R. Nieva, C. M. Sullivan, E. M. Edwards, P. Sommer, K. Csiszar, M. J. Hendrix (2002). "A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion." *Cancer Res* 62(15): 4478-4483.

Klaes, R. e. a. (2001). OVEREXPRESSION OF p16INK4A AS A SPECIFIC MARKER FOR DYSPLASTIC. *International Journal of Cancer*: 276-284.

Kollias, J., C. W. Elston, I. O. Ellis, J. F. Robertson, R. W. Blamey (1997). "Early-onset breast cancer--histopathological and prognostic considerations." *Br J Cancer* 75(9): 1318-1323.

Kreienberg, R., U. Albert, M. Follmann (2012). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Version 3.0.W. Zuckschwerdt Verlag GmbH. Gemering.

Leidy, J., A. Khan, D. Kandil (2014). "Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features." *Arch Pathol Lab Med* 138(1): 37-43.

Lim, Y. J., Y. H. Kim, G. H. Ahn, H. K. Chun, W. Y. Jang, J. H. Lee, H. J. Son, P. L. Rhee, J. J. Kim, S. W. Paik, B. C. Yoo, J. C. Rhee (2004). "Cyclin E, p27 and mutant p53 do not predict the prognosis in AJCC stage II colorectal carcinomas." *Korean J Gastroenterol* 44(6): 314-320.

Lonning, P. E. (2012). "Poor-prognosis estrogen receptor- positive disease: present and future clinical solutions." *Ther Adv Med Oncol* 4(3): 127-137.

Lucero, H. A., H. M. Kagan (2006). "Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function." *Cell Mol Life Sci* 63(19-20): 2304-2316.

Lucero, H. A., J. M. Maki, H. M. Kagan (2011). "Activation of cellular chemotactic responses to chemokines coupled with oxidation of plasma membrane proteins by lysyl oxidase." *J Neural Transm* 118(7): 1091-1099.

Lucero, H. A., K. Ravid, J. L. Grimsby, C. B. Rich, S. J. DiCamillo, J. M. Maki, J. Myllyharju, H. M. Kagan (2008). "Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* 283(35): 24103-24117.

Lumachi, F., A. Brunello, M. Maruzzo, U. Basso, S. M. Basso (2013). "Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer." *Curr Med Chem* 20(5): 596-604.

Maki, J. M., H. Tikkanen, K. I. Kivirikko (2001). "Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains." *Matrix Biol* 20(7): 493-496.

Marshall, M., S. Solomon (2007). "Hereditary breast-ovarian cancer: clinical findings and medical management." *Plast Surg Nurs* 27(3): 124-127.

Mendes, D., C. Alves, N. Afonso, F. Cardoso, J. L. Passos-Coelho, L. Costa, S. Andrade, F. Batel-Marques (2015). "The benefit of HER2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic HER2-positive breast cancer--a systematic review." *Breast Cancer Res* 17: 140.

Min, C., K. H. Kirsch, Y. Zhao, S. Jeay, A. H. Palamakumbura, P. C. Trackman, G. E. Sonenshein (2007). "The tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu-driven breast cancer." *Cancer Res* 67(3): 1105-1112.

Molnar, J., K. S. Fong, Q. P. He, K. Hayashi, Y. Kim, S. F. Fong, B. Fogelgren, K. M. Szauter, M. Mink, K. Csiszar (2003). "Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins." *Biochim Biophys Acta* 1647(1-2): 220-224.

Nishioka, T., A. Eustace, C. West (2012). "Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment." *Cell Struct Funct* 37(1): 75-80.

Ozdener, G. B., M. V. Bais, P. C. Trackman (2016). "Determination of cell uptake pathways for tumor inhibitor lysyl oxidase propeptide." *Mol Oncol* 10(1): 1-23.

Paik, S., S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker, M. Cronin, F. L. Baehner, M. G. Walker, D. Watson, T. Park, W. Hiller, E. R. Fisher, et al. (2004). "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer." *N Engl J Med* 351(27): 2817-2826.

Petrucelli, N., M. B. Daly, G. L. Feldman (2010). "Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2." *Genet Med* 12(5): 245-259.

Preston, D. L., A. Mattsson, E. Holmberg, R. Shore, N. G. Hildreth, J. D. Boice, Jr. (2002). "Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts." *Radiat Res* 158(2): 220-235.

Rasmussen, B. B., M. Andersson, I. J. Christensen, S. Moller (2008). "Evaluation of and quality assurance in HER2 analysis in breast carcinomas from patients registered in Danish Breast Cancer Group (DBCG) in the period of 2002-2006. A nationwide study including correlation between HER-2 status and other prognostic variables." *Acta Oncol* 47(4): 784-788.

Reinier, K. S., P. M. Vacek, B. M. Geller (2007). "Risk factors for breast carcinoma in situ versus invasive breast cancer in a prospective study of pre- and post-menopausal women." *Breast Cancer Res Treat* 103(3): 343-348.

RKI (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Rucksaldruck GmbH & Co KG. Berlin.

Roddam, A. W., K. Pirie, M. C. Pike, C. Chilvers, B. Crossley, C. Hermon, K. McPherson, J. Peto, M. Vessey, V. Beral (2007). "Active and passive smoking and the risk of breast cancer in women aged 36-45 years: a population based case-control study in the UK." *Br J Cancer* 97(3): 434-439.

Rosenberg, L., Y. Zhang, P. F. Coogan, B. L. Strom, J. R. Palmer (2009). "A case-control study of oral contraceptive use and incident breast cancer." *Am J Epidemiol* 169(4): 473-479.

Rubin, G. D., J. K. Lyo, D. S. Paik, A. J. Sherbondy, L. C. Chow, A. N. Leung, R. Mindelzun, P. K. Schraedley-Desmond, S. E. Zinck, D. P.

Naidich, S. Napel (2005). "Pulmonary nodules on multi-detector row CT scans: performance comparison of radiologists and computer-aided detection." *Radiology* 234(1): 274-283.

Saito, H., J. Papaconstantinou, H. Sato, S. Goldstein (1997). "Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence." *J Biol Chem* 272(13): 8157-8160.

Sanchez-Morgan, N., K. H. Kirsch, P. C. Trackman, G. E. Sonenshein (2011). "The lysyl oxidase propeptide interacts with the receptor-type protein tyrosine phosphatase kappa and inhibits beta-catenin transcriptional activity in lung cancer cells." *Mol Cell Biol* 31(16): 3286-3297.

Scola, N., T. Gorogh (2010). "LOXL4 as a selective molecular marker in primary and metastatic head/neck carcinoma." *Anticancer Res* 30(11): 4567-4571.

Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, W. L. McGuire (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." *Science* 235(4785): 177-182.

Stickeler, E., A. Schneeweiss (2013). Aktuelle Empfehlungen zur Prävention, Diagnostik und Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome, Adjuvante Chemotherapie und Antikörpertherapie. W. Zuckschwerdt Verlag GmbH. Gemering.

Tian, M., W. Liu, L. Jin, X. Jiang, L. Yang, Z. Ding, Y. Shen, Y. Peng, D. Gao, L. Li, J. Zhou, S. Qiu, et al. (2015). "LOXL4 is downregulated in hepatocellular carcinoma with a favorable prognosis." *Int J Clin Exp Pathol* 8(4): 3892-3900.

Vasconcelos, I., A. Hussainzada, S. Berger, E. Fietze, J. Linke, F. Siedentopf, W. Schoenegg (2016). "The St. Gallen surrogate classification for breast cancer subtypes successfully predicts tumor presenting features, nodal involvement, recurrence patterns and disease free survival." *Breast* 29: 181-185.

Voduc, K. D., M. C. Cheang, S. Tyldesley, K. Gelmon, T. O. Nielsen, H. Kennecke (2010). "Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse." *J Clin Oncol* 28(10): 1684-1691.

Wang, S. X., M. Mure, K. F. Medzihradsky, A. L. Burlingame, D. E. Brown, D. M. Dooley, A. J. Smith, H. M. Kagan, J. P. Klinman (1996). "A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains." *Science* 273(5278): 1078-1084.

Weise, J. B., P. Rudolph, A. Heiser, M. L. Kruse, J. Hedderich, C. Cordes, M. Hoffmann, O. Brant, P. Ambrosch, K. Csiszar, T. Gorogh (2008). "LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck cancer." *Eur J Cancer* 44(9): 1323-1331.

Wiel, C., A. Augert, D. F. Vincent, D. Gitenay, D. Vindrieux, B. Le Calve, V. Arfi, H. Lallet-Daher, C. Reynaud, I. Treilleux, L. Bartholin, E. Lelievre, et al. (2013). "Lysyl oxidase activity regulates oncogenic stress response and tumorigenesis." *Cell Death Dis* 4: e855.

Witherby, S. M., H. B. Muss (2005). "Special issues related to breast cancer adjuvant therapy in older women." *Breast* 14(6): 600-611.

Wittekind, C., I. Tischoff (2004). "[Tumor classifications]." *Pathologe* 25(6): 481-490.

Wong, C. C., D. M. Gilkes, H. Zhang, J. Chen, H. Wei, P. Chaturvedi, S. I. Fraley, C. M. Wong, U. S. Khoo, I. O. Ng, D. Wirtz, G. L. Semenza (2011). "Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(39): 16369-16374.

Wong, C. C., H. Zhang, D. M. Gilkes, J. Chen, H. Wei, P. Chaturvedi, M. E. Hubbi, G. L. Semenza (2012). "Inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 block breast cancer metastatic niche formation and lung metastasis." *J Mol Med (Berl)* 90(7): 803-815.

Wörmann, B. (2014). *Krebsfrüherkennung in Deutschland 2014: Evidenz, aktueller Stand, Perspektiven*. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie: Gesundheitspolitische Schriftenreihe der DGHO. M. Freund, D. Lüftner and M. Wilhelm. 4, 41 - 56, DGHO, Berlin.

Wu, G., Z. Guo, X. Chang, M. S. Kim, J. K. Nagpal, J. Liu, J. M. Maki, K. I. Kivirikko, S. P. Ethier, B. Trink, D. Sidransky (2007). "LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer." *Cancer Res* 67(9): 4123-4129.

Wu, L., Y. Zhu (2015). "The function and mechanisms of action of LOXL2 in cancer (Review)." *Int J Mol Med* 36(5): 1200-1204.

Xiao, Q., G. Ge (2012). "Lysyl oxidase, extracellular matrix remodeling and cancer metastasis." *Cancer Microenviron* 5(3): 261-273.

Yang, L. H., H. S. Tseng, C. Lin, L. S. Chen, S. T. Chen, S. J. Kuo, D. R. Chen (2012). "Survival benefit of tamoxifen in estrogen receptor-negative and progesterone receptor-positive low grade breast cancer patients." *J Breast Cancer* 15(3): 288-295.

Zheng, Y., X. Wang, H. Wang, W. Yan, Q. Zhang, X. Chang (2014). "Expression of the lysyl oxidase propeptide in hepatocellular carcinoma and its clinical relevance." *Oncol Rep* 31(4): 1669-1676.

7. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Petra Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Überlassung des Arbeitsplatzes in der Abteilung der „Experimentellen Onkologie“.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Tibor Görögh für die Bereitstellung der Doktorarbeit und die hervorragende und engagierte Betreuung während aller Phasen meiner Dissertation. Die kollegiale und freundliche Art und Weise unserer Zusammenarbeit habe ich sehr genossen.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Susanne Elgar Quabius für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung, die weithin zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Mein größter Dank gilt meinen lieben Eltern Ute und Jürgen, sowie meiner Lebensgefährtin Vivian Serke für die tolle Unterstützung und die unzähligen Motivationsschübe während dieses Lebensabschnittes.

Vielen herzlichen Dank!!!

8. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation – abgesehen von der Beratung durch meinen akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder im Ganzen noch zum Teil an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen. Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits publiziert (siehe unten).

Kiel, den (Christian Kademann)

Kongress-Abstract und Posterpräsentation:

Kademann C, Quabius ES, Serke V, Alkatout I, Wenners A, Klapper W, Bauer M, Arnold N, Görögh T (2016)

LOXL4-Antigen-Expression und ihre klinisch-pathologische Bedeutung bei Mammakarzinomen: eine immunhistochemische Analyse

61. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe vom 19. bis 22. Oktober 2016 in Stuttgart

Poster 76 - P006

<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0036-1592666>